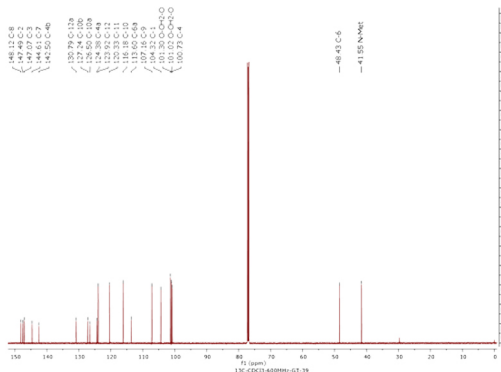




Métodos de bioevaluación de compuestos bioactivos



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS**

Rectora

Dra. Viridiana Aydeé León Hernández

Secretaria General

Mtra. María Delia Adame Arcos

Secretaria Académica

Dra. Elisa Lugo Villaseñor

Secretario de Extensión

Dr. Gerardo Gama Hernández

Abogado General

Mtro. Ulises Flores Peña

Tesorera General

C. P. C. Rosario Jiménez Bustamante

**Coordinador General de Planeación
y Desarrollo Sustentable**

Dr. Juan Manuel Rivas González

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

Rectora

Dra. Norma Liliana Galván Meza

Secretaria General

Mtra. Margarete Moeller Porraz

**Secretaria de Extensión
y Vinculación**

Dra. Teresa Aidé Iniesta Ramírez

**Directora de Fomento Editorial
y Artes Gráficas**

Lic. Ana Cristina Álvarez Castañeda

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

Rector General

Dr. José Antonio De los Reyes Heredia

Secretaria General

Dra. Norma Rondero López

UNIDAD IZTAPALAPA

Rectora de Unidad

Dra. Verónica Medina Bañuelos

Secretario de la Unidad

Dr. Javier Rodríguez Lagunas

**Director de la División de Ciencias
Biológicas y de la Salud**

Dr. José Luis Gómez Olivares

**Coordinador de Extensión
Universitaria**

Dr. Rodolfo Palma Rojo

**Jefe de la Sección de Producción
Editorial**

Lic. Adrián F. Valencia Llamas

Métodos de bioevaluación de compuestos bioactivos

Editores

*Myrna Déciga Campos
Samuel Enoch Estrada Soto*

*Métodos de bioevaluación
de compuestos bioactivos*

Primera edición: diciembre 2023

© UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS

Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa,
C. P. 62209, Cuernavaca, Morelos,
México.
publicaciones@uaem.mx / libros.uaem.mx

ISBN: 978-607-8951-25-3

©UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

Ciudad de la Cultura s/n, Col. Centro,
Tepic, Nayarit, México, C. P. 63000.

Dirección de Fomento Editorial
y Artes Gráficas
Tel. 311 211 8800 Ext. 8718 / 8838
www.uan.edu.mx / editorial@uan.edu.mx

ISBN: 978-607-8863-36-5

©UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Av. San Rafael Atlixco No. 186,
Col. Leyes de Reforma, 1ª Sección,
Alcaldía Iztapalapa, C. P. 09310,
Ciudad de México.
produccion_editorial@xanum.uam.mx

ISBN: 978-607-28-3025-7

Editado en Ciudad de México

Contenido

Capítulo 1. Diseño y desarrollo de compuestos bioactivos de origen sintético	17
1.1 Introducción	19
1.2 Compuesto bioactivo, fármaco, medicamento y droga	19
1.3 Fragmentos estructurales de una molécula bioactiva	20
1.4 Desarrollo de fármacos y descubrimiento de moléculas bioactivas	22
1.5 Definición de análogo	23
1.6 Diseño racional de moléculas bioactivas	24
1.7 Las tres fases de la acción de los fármacos	25
1.8 Biosimulación predictiva	29
1.8.1 Ensayos <i>in silico</i> : Predicciones farmacodinámicas	30
1.8.2 Predicciones farmacocinéticas	32
1.8.3 Detección de alertas toxicológicas	34
Conclusiones	39
Referencias	39
 Capítulo 2. Introducción a los métodos analíticos para el desarrollo de moléculas bioactivas	 43
2.1 Introducción	45
2.2 Identificación de compuestos bioactivos en fuentes naturales ..	51
2.3 Técnicas de cromatografía de líquidos acoplados a espectrometría de masas, para la evaluación de la composición química y la investigación en productos naturales: un panorama general ...	54
Referencias	56

Capítulo 3. Comités de Ética para el uso de animales de laboratorio	61
3.1 Uso ético de los animales de laboratorio	63
3.2 Normativas para el uso de animales en investigación	63
3.3 Normatividad en América Latina y México	66
3.4 El principio de las Tres Erres (3Rs)	68
3.4.1 Centros internacionales de las 3Rs	71
3.4.2 Cuidado humanitario	73
3.5 Programa de cuidado y uso de animales	74
3.5.1 Comité interno de cuidado y uso de animales de Laboratorio (CICUAL)	74
3.5.2 Integración del CICUAL	75
3.5.3 Responsabilidades del CICUAL	76
3.5.4 Capacitación y educación	76
3.5.5 Seguridad y salud ocupacional del personal	78
3.5.6 Revisión de protocolos	78
3.5.7 Monitoreo post aprobación	79
3.5.8 Planificación para desastres y preparación para emergencias	80
3.5.9 Confidencialidad	81
3.6 Punto final humanitario y punto final experimental	81
3.6.1 Hoja de valoración	84
3.7 Pautas ARRIVE	84
Conclusiones	86
Referencias	88

Capítulo 4. Manejo adecuado de animales de laboratorio, vías de administración de fármacos y toma de muestras sanguíneas	91
4.1 Introducción	93
4.2 Manejo adecuado de roedores como animales de laboratorio	93
4.2.1 Aclimatación a la nueva vivienda	94
4.2.2 Manipulación del nido y actitud de la madre	95
4.2.3 Técnicas de inmovilización para realizar procedimientos experimentales en ratas	96
4.2.4 Técnicas de inmovilización para realizar procedimientos experimentales en ratones	98
4.3. Vías de administración de fármacos	98
4.3.1 Procedimientos de vías de administración	100
4.3.2 Errores comunes en la administración de fármacos	106
4.4 Toma de muestras	106
4.4.1 Toma de muestra sanguínea	106
4.4.2 Toma de muestra del seno venoso retro-orbital	107
4.4.3 Toma de muestra de la vena submaxilar o seno venoso submandibular	109
4.4.4 Toma de muestra de la vena safena	110
4.4.5 Toma de muestra de la vena caudal	111
4.4.6 Toma de muestra de la vena yugular	112
4.4.7 Toma de muestra por punción cardíaca (cardiocentesis)	112
4.4.8 Obtención de muestra por decapitación	114
Conclusiones	114
Referencias	116

Capítulo 5. Modelos experimentales para la evaluación de compuestos bioactivos con actividad antihipertensiva	119
5.1 Introducción	121
5.2 Factores vasculares involucrados en la patogénesis de la hipertensión	123
5.3 Modelo de órgano aislado	130
5.3.1 Sistema de determinación del efecto vasorrelajante en órgano aislado	130
5.4 Modelo genético de hipertensión primaria o esencial	131
5.4.1 Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR)	131
5.5 Modelos de hipertensión secundaria	133
5.5.1 Hipertensión provocada por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	133
5.5.2 Hipertensión inducida por infusión continua de angiotensina II	135
5.6 Registro de la presión arterial	137
5.7 Evaluación de tratamientos antihipertensivos	138
5.8 Respuestas presoras <i>in vivo</i> en ratas descerebradas y desmeduladas	138
Conclusión	140
Referencias	140
 Capítulo 6. Modelos de evaluación biológica para la investigación de compuestos con potencial actividad antidiabética	 145
6.1 Diabetes mellitus	147
6.2 Diagnóstico de la diabetes mellitus	147
6.3 Epidemiología de la diabetes mellitus	149
6.4 Clasificación de la diabetes mellitus	149
6.4.1 Diabetes tipo 1 (DT1)	149

6.4.2	Diabetes tipo 2 (DT2)	150
6.4.3	Diabetes mellitus tipo MODY y gestacional	151
6.5	Fisiopatología de la DT2	151
6.6	Principales complicaciones asociadas a la DT2	154
6.7	Fármacos para el tratamiento de DT2	154
6.8	Modelos murinos experimentales de diabetes	156
6.8.1	Métodos químicos de diabetización murina	157
6.8.2	Modelos espontáneos y genéticamente modificados de DM	158
6.8.2.1	Modelos de diabetes tipo 1 (DT1)	159
6.8.2.2	Modelos de diabetes tipo 2 (DT2)	159
6.9	Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)	162
6.10	Prueba de tolerancia a la insulina (PTI)	164
6.11	Modelos celulares de experimentación	165
6.11.1	Adipocitos 3T3-L1	165
6.11.2	Mioblastos C2C12	166
6.11.3	Células pancreáticas RIN-m5F	166
6.11.4	Hepatocitos HepG2	166
6.12	Inmunodetección de GLUT4 por microscopía confocal	167
6.13	Ensayo de incorporación de glucosa	167
6.14	Tinción con rojo oleoso	169
	Conclusión	170
	Referencias	172
Capítulo 7. Modelos de evaluación preclínica de compuestos con posible actividad antiasmática		183
7.1	Mecanismos inmunológicos del asma alérgica	186

7.1.1	Sensibilización a un alérgeno	186
7.2	Mecanismo de contracción del músculo liso bronquial	188
7.3	Terapias actuales en el tratamiento del asma	191
7.4	Modelos farmacológicos para la evaluación de fármacos antiasmáticos	192
7.4.1	Modelos con roedores que semejan la bronco-constricción (modelo <i>ex vivo</i>)	193
7.4.1.1	Determinación de mecanismo de acción en el modelo <i>ex vivo</i>	195
7.4.2	Modelos con roedores que semejan el proceso asmático	195
7.4.2.1	Modelo de asma alérgica en ratones	197
7.4.2.2	Asma alérgica en cobayo por pletismografía con respiración espontánea	197
7.5	Evaluación farmacológica antiasmática en la búsqueda de nuevos fármacos	200
	Referencias	202
	Capítulo 8. Evaluación de compuestos bioactivos en modelos experimentales de afecciones del sistema nervioso central	207
8.1	Introducción	209
8.2	Alteraciones más frecuentes del sueño. Insomnio	211
8.2.1	Epidemiología	213
8.2.2	Síntomas	214
8.2.3	Diagnóstico	214
8.2.4	Clasificación	215
8.2.5	Terapéutica	215
8.2.6	Modelos experimentales para el estudio de alteraciones del sueño	218

8.2.7	Investigación de compuestos bioactivos para el insomnio	221
8.3	Ansiedad	222
8.3.1	Epidemiología	222
8.3.2	Síntomas	223
8.3.3	Diagnóstico	224
8.3.4	Clasificación	224
8.3.5	Terapéutica	225
8.3.6	Modelos experimentales de ansiedad	227
8.3.6.1	Modelo de campo abierto	228
8.3.6.2	Modelo del tablero con orificios	229
8.3.6.3	Modelo de exploración en cilindro	231
8.3.6.4	Modelo de Cruz elevada o <i>plus-maze</i>	231
8.3.7	Búsqueda de compuestos bioactivos con actividad ansiolítica	233
8.4	Epilepsia	234
8.4.1	Epidemiología	234
8.4.2	Síntomas	235
8.4.3	Diagnóstico	235
8.4.4	Clasificación	236
8.4.4.1	Crisis focales	237
8.4.4.2	Crisis generalizadas	237
8.4.5	Terapéutica	239
8.4.6	Modelos experimentales de crisis convulsivas y epilepsia	239
8.4.6.1	Pentilentetrazol (PTZ)	243
8.4.6.2	Modelo de electrochoque máximo	246
8.4.6.3	<i>Kindling</i>	247

8.4.7 Estudios farmacológicos para la obtención de compuestos bioactivos anticonvulsivos y/o antiepilépticos	247
Conclusión	249
Referencias	249
Capítulo 9. Métodos de bioevaluación para la búsqueda de moléculas con efecto espasmolítico y/o neuroprotector, utilizando el modelo de íleon aislado de cobayo	261
9.1 Modelo <i>in vitro</i> de íleon aislado de cobayo	263
9.2 Antecedentes que sustentan el uso del modelo de íleon de cobayo para la determinación del efecto espasmolítico de diversos tratamientos	264
9.2.1 Espasmos intestinales	264
9.2.2 Anatomía y fisiología del intestino delgado	265
9.2.3 Sistema nervioso entérico (SNE)	267
9.2.4 Mecanismo de acción de los agentes espasmolíticos	268
9.2.5 Protocolos para el estudio del efecto espasmolítico en el íleon aislado de cobayo	270
9.2.6 Determinación del efecto espasmolítico del extracto de una planta y su comparación con un compuesto conocido, utilizando el modelo de íleon de cobayo	271
9.3 Antecedentes que sustentan el uso del modelo de íleon de cobayo para la determinación del efecto neuroprotector de diversos tratamientos	276
9.3.1 Neuroprotectores	277
9.3.2 Enfermedad vascular cerebral (EVC)	277
9.3.3 Fisiopatología del daño inducido por la isquemia	278
9.3.4 Modelos experimentales de daño por isquemia	280

9.3.5	Modelo de íleon de cobayo para evaluar efecto neuroprotector	281
9.3.6	Determinación del efecto neuroprotector de dos extractos, utilizando el modelo de isquemia de íleon de cobayo	284
	Referencias	287
Capítulo 10. Modelos preclínicos para la evaluación de compuestos con potencial actividad antinociceptiva		293
10.1	Introducción	295
10.2	Nocicepción	297
10.3	Evaluación del dolor y la nocicepción	298
10.4	Evaluación de nocicepción en roedores	302
10.4.1	Modelos de nocicepción que semejan un dolor de tipo nociceptivo	304
10.4.2	Modelos de nocicepción que semejan un dolor de tipo nociceptivo-inflamatorio	308
10.4.3	Modelos de nocicepción de tipo neuropática	316
	Conclusiones	320
	Referencias	320
Capítulo 11. Modelos in vitro para la bioevaluación de nuevos agentes antibacterianos		325
11.1	Generalidades	327
11.2	Epidemiología	328
11.3	Métodos de bioevaluación	331
11.3.1	Método de difusión en agar	332
11.3.2	Bioautografía	334
11.3.3	Dilución en medio de cultivo	335
11.4	Bioensayo de microdilución en caldo	338

11.4.1 Metodología para determinar la CMI del agente mediante REMA	338
11.4.1.1 Preparación de los antibióticos como control positivo	338
11.4.1.2 Reactivación de cepas bacterianas	339
11.4.1.3 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo	339
11.4.1.4 Preparación de disoluciones stock del agente antimicrobiano a evaluar	341
11.4.1.5 Preparación de disoluciones de trabajo de extractos, fracciones o compuestos a evaluar	341
11.4.1.6 Preparación de la solución de resazurina	341
11.4.1.7 Preparación de la microplaca	341
11.4.1.8 Revelado del bioensayo	343
11.4.1.9 Interpretación de los resultados de CMI	343
11.4.2 Metodología para determinar la concentración mínima bactericida del agente antimicrobiano mediante REMA	343
11.4.2.1 Resiembra en medio de cultivo líquido	344
Conclusiones	346
Referencias	346
Capítulo 12. Métodos experimentales de evaluación de nuevos agentes contra la leishmaniasis y tripanosomiasis	357
12.1 Leishmaniasis	359
12.1.1 Epidemiología	359
12.1.2 Mecanismos fisiopatológicos	360
12.1.3 Modelo de bioensayo	361
12.1.4 Técnicas especializadas de bioensayos	362

12.2 Tripanosomiasis	365
12.2.1 Epidemiología	365
12.2.2 Mecanismos fisiopatológicos	366
12.2.3 Modelo de bioensayo	367
12.2.4 Técnicas especializadas de bioensayos	368
Referencias	369
Índice de autores	373

Capítulo 1.

Diseño y desarrollo de compuestos bioactivos de origen sintético

Gabriel Navarrete Vázquez*

* Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

1.1 Introducción

La Química es la ciencia que estudia la composición, estructura y propiedades de la materia, así como los cambios que ésta experimenta durante sus transformaciones (Chang, 2018: 1-3). Por otra parte, la Farmacia es la ciencia y práctica de la preparación, conservación, evaluación, control, dispensación, empleo y vigilancia de medicamentos. Es una profesión que une a las ciencias de la salud con las ciencias químicas y tiene como objetivo garantizar un uso seguro y eficaz de los medicamentos (Allen, 2013: 1).

En este contexto y de acuerdo con la definición de la IUPAC, la **Química Farmacéutica** es la aplicación de los principios de química y farmacología al diseño, descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del mecanismo de acción de un compuesto bioactivo a nivel molecular, esto incluye el estudio de su metabolismo y la construcción de relaciones estructura química-actividad biológica (Wermuth et al., 1998). Un contenido tan amplio exige una base firme de conocimientos, tanto químicos como farmacológicos (Delgado-Cirilo et al., 2003: 2-4).

1.2 Compuesto bioactivo, fármaco, medicamento y droga

Los nuevos agentes terapéuticos que se encuentran en investigación preclínica, también llamados **compuestos bioactivos**, son entidades químicas de origen natural, sintético o biotecnológico que muestran algún tipo de actividad farmacológica (Gillespie y Goodnow, 2004), la cual puede ser terapéutica o tóxica y se dividen en:

1. Compuestos activos ordinarios, cuya magnitud de potencia (medida en forma de concentraciones medias: CI_{50} , CE_{50} o CC_{50}) ronda los 10 y hasta los 100 μM ,
2. Compuestos *Hits*, cuya potencia farmacológica se ubica entre 1 y 10 μM ,
3. Compuestos *Lead* (Líderes o cabeza de serie), cuya potencia muestra magnitudes de orden nanomolar ($< 1\ 000\ nM$).

Los compuestos bioactivos también son llamados nuevas entidades químicas o nuevas entidades moleculares.

Por otro lado, los **fármacos** se definen como toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento (Ley General de Salud, artículo 221). También se le conoce como ingrediente farmacéutico activo (IFA). Generalmente se les da este nombre cuando pasan a las fases clínicas de experimentación.

El **medicamento** es la conjunción del IFA, los excipientes y la forma farmacéutica que sirve para procurar la salud en forma total o parcial, restableciendo el equilibrio en las funciones de un organismo (Ley General de Salud, artículo 221). El término **droga** tiene dos acepciones en nuestra lengua: estrictamente significa una materia prima de origen vegetal o animal que contiene uno o varios principios activos y que no ha sufrido manipulación, salvo la necesaria para su conservación (Mata Essayag, 2000: 2). La otra acepción se refiere a un fármaco psicoactivo, es decir, una sustancia que altera los sentidos, la percepción, el estado de ánimo o comportamiento, ya que actúa en el sistema nervioso central y es sinónimo de sustancia de abuso (Brailowsky, 2002: 237-243). Es importante utilizar de forma adecuada estos términos y no mezclarlos o confundirlos.

La obtención de un compuesto bioactivo puede realizarse de distintas maneras. Tradicionalmente, el uso de información etnomédica, así como el estudio de la actividad biológica de productos del metabolismo secundario de organismos vivos, ha sido una fuente interesante de obtención de agentes terapéuticos (Mata Essayag, 2000: 4-6). Así mismo, el descubrimiento accidental de actividades farmacológicas en compuestos sintéticos orgánicos e inorgánicos, el reposicionamiento de fármacos (nuevos usos para fármacos viejos) y la estrategia de diseño racional basado en planteamientos químicos y farmacológicos han dado excelentes resultados (Avendaño, 2004: 25-27).

1.3 Fragmentos estructurales de una molécula bioactiva

Una molécula bioactiva consta de 4 grupos específicos presentados en una matriz geométrica definida, que permite una interacción de unión con un sitio de reconocimiento (Figura 1) (Nogrody y Weaver, 2005: 19-20). La

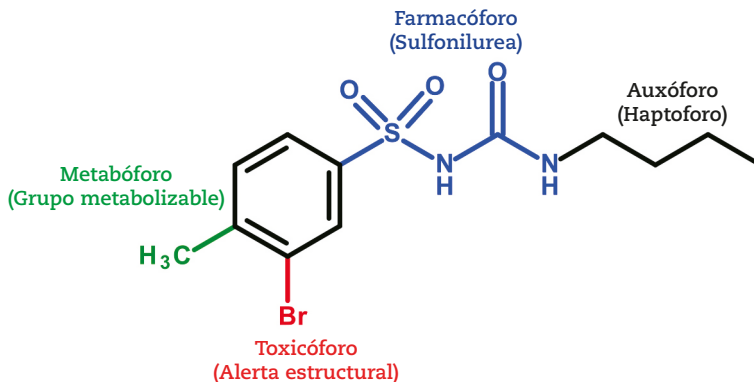


Figura 1. Fragmentos estructurales de una molécula bioactiva hipotética. **Farmacóforo:** fragmento de sulfonilurea, considerado como agente secretagogo. **Auxóforo:** cadena alquímica que refuerza las interacciones de la sulfonilurea con el canal de potasio dependiente de ATP. **Metabóforo:** grupo metilo que se oxida rápidamente en el organismo por reacciones de Fase I para producir el metabolito ácido carboxílico, que es más soluble en agua y además es sustrato de reacciones de Fase II de glucuronidación. **Toxicóforo:** átomo de bromo que representa una alerta estructural debido a su toxicidad intrínseca como agente hepato- y nefrotóxico.

disposición tridimensional de átomos dentro de una molécula bioactiva, que permite una interacción de unión específica con un receptor deseado, se denomina farmacóforo. El **farmacóforo** es la parte responsable de la bioactividad de la molécula y es la porción que establece interacciones intermoleculares con el sitio de acción.

Un farmacóforo es un ensamble de factores estereoelectrónicos necesario para asegurar una óptima interacción supramolecular entre la molécula y un sitio blanco específico, lo que genera una respuesta biológica (Nogady y Weaver, 2005: 19-20, 106). Por otro lado, se tiene al **auxóforo o haptoforo** que es la parte de la molécula que refuerza las interacciones del farmacóforo. Es en esta región donde hay que realizar las modificaciones moleculares, con el fin de mejorar la afinidad con el sitio de acción y aumentar la potencia del compuesto (Silverman y Holladay, 2014: 55-56). Si el farmacóforo es modificado, se corre el riesgo de que la actividad disminuya o se pierda definitivamente. El tercer fragmento estructural es denominado **toxicóforo**: un arreglo tridimensional de átomos responsable de la acción tóxica de la molécula (ejem., bromo o yodoaromáticos, halogenuros de alquilo, epóxidos,

carbonilos α,β -insaturados, etc.) (Li, 2020: 305-306). Por último, se tiene al **metabóforo**, otro arreglo tridimensional de átomos responsable de la bioactivación o metabolismo del compuesto (metilbencenos, ésteres, amidas, nitró, cetonas, alcoholes primarios y secundarios, fenoles, etc.) (Silverman y Holladay, 2014: 55, 66).

1.4 Desarrollo de fármacos y descubrimiento de moléculas bioactivas

Por lo general, es probable que la escala de tiempo para desarrollar un nuevo fármaco a partir de un compuesto bioactivo lleve de 10 a 20 años, con una inversión millonaria de más de \$1,700 millones de dólares, y no hay garantía de que el producto tenga un impacto adecuado en el proceso de la enfermedad (Huang y Aslanian, 2012: 1-8). Esta molécula debe contar con las características deseadas para el fármaco ideal: seguridad, calidad y eficacia.

Los fármacos de origen sintético son muy importantes ya que abren la puerta a un nuevo tratamiento terapéutico, se les denomina fármacos innovadores porque se utilizan para ser pioneros en un nuevo tipo de terapia o para lograr una mejora notable en la condición de enfermedad. Este tipo de fármaco se denomina a menudo “el primero de su clase” y puede surgir a través de la observación de un efecto secundario de un fármaco que ya está en uso, pero que luego puede explotarse haciendo un análogo (Wermuth, 2015: 311). El efecto secundario puede ser el resultado de una observación astuta realizada durante estudios farmacológicos en animales o de investigaciones clínicas en pacientes.

A menudo se conoce suficiente información molecular sobre el blanco terapéutico (puede ser la estructura cristalina de una proteína, ácido nucleico, etc., que muestra la geometría precisa del sitio de reconocimiento molecular), para intentar diseñar directamente una molécula de fármaco que se ajuste a ese sitio de acción. A esta situación se le denomina “diseño de fármacos asistido por la estructura del blanco terapéutico”, y hasta la fecha se han dado ejemplos en el campo de la investigación de fármacos antivirales y antihipertensivos (Wermuth, 2015: 497).

Por otra parte, el “diseño de fármacos basados en análogos estructurales” propone la preparación de un análogo de un fármaco establecido, y tiene

la ventaja considerable de que ya se ha probado el uso terapéutico previsto. Esto elimina una gran incertidumbre del riesgo general de éxito. No obstante, todavía quedan muchos obstáculos por superar, en particular con respecto al comportamiento farmacocinético y la seguridad. Es importante identificar al comienzo del programa de investigación la ventaja clínica esperada del análogo sobre el fármaco establecido que se utiliza como guía (Wermuth, 2015: 489). El objetivo debe ser proporcionar una mejora en el uso como medicamento. Los productos análogos a menudo se consideran compuestos “*me-too*” o copias, un término utilizado de manera peyorativa para sugerir que debido a que un fármaco innovador ha demostrado ser comercialmente valioso, otras empresas quieren participar del éxito comercial (Silverman y Holladay, 2014: 10).

1.5 Definición de análogo

Un compuesto análogo es aquel que tiene una relación química y / o farmacológica con otro fármaco existente (Korolkovas, 2011: 94). Los análogos se clasifican en tres categorías (Figura 2) (Wermuth, 2015: 76):

1. Análogos que presentan tanto similitudes químicas, como farmacológicas (Análogos reales/*me-too drugs*/fármacos copia): Se consideran análogos directos a las moléculas que tienen farmacóforos idénticos, es decir, pueden describirse mediante una estructura general que incluye la mayor parte del esqueleto químico
2. Análogos que solo presentan similitud química (Análogos estructurales/*activity cliffs*/ abismos-acantilados en la actividad). Son moléculas que tienen una estructura química similar, pero que tienen propiedades farmacológicas bastante diferentes.
3. Análogos que muestran propiedades farmacológicas similares, pero estructuras químicas distintas (Análogos funcionales/*scaffold hopping*/armazón bio-sinonímico): Son moléculas que tienen una actividad farmacológica similar sin tener ninguna relación química o estructural discernible. Esto significa que existen diferentes farmacóforos para explicar la misma actividad biológica de moléculas estructuralmente diferentes.

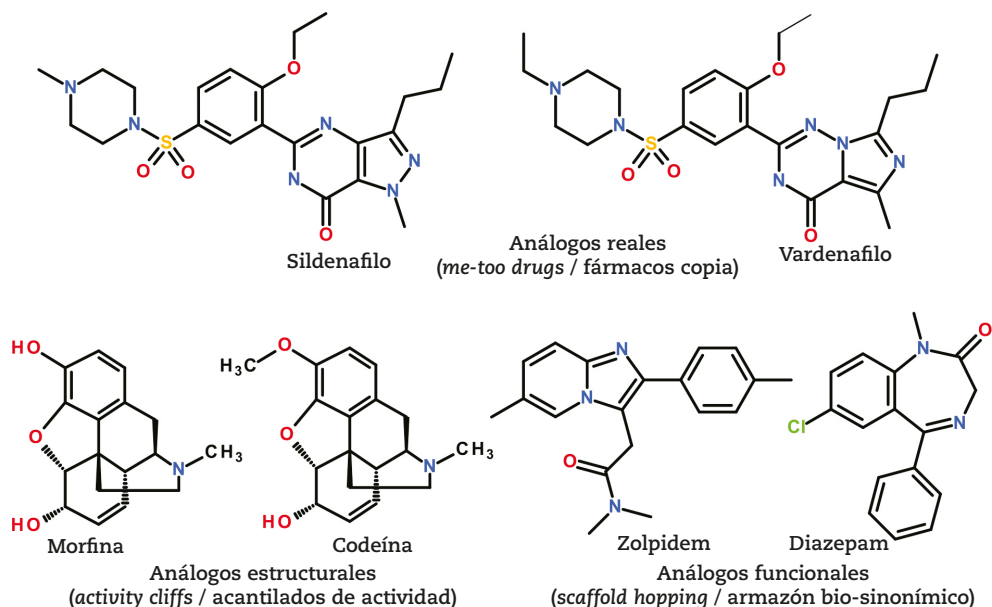


Figura 2. Tipos de análogos. **Análogos reales:** el vardenafil se considera una copia del sildenafil, el primer inhibidor de la fosfodiesterasa-5. Las diferencias radican en la N-metilpiperazina del sildenafil, con la N-etilpiperazina del vardenafil, así como el cambio de pirazol por imidazol en el núcleo base. **Análogos estructurales:** la morfina y la codeína mantienen el mismo núcleo químico, pero la morfina posee un efecto analgésico y la codeína un efecto antitusivo. **Análogos funcionales:** el diazepam pertenece al grupo químico de las benzodiazepinas, mientras que el zolpidem es una imidazopiridina. Sin embargo, ambos son agonistas de los receptores GABA_A y poseen efectos hipnóticos.

1.6 Diseño racional de moléculas bioactivas

Un fármaco no se descubre, se desarrolla a partir de un compuesto bioactivo diseñado racionalmente, o encontrado como prototipo en la naturaleza (Silverman y Holladay, 2014: 379-380). Sin bien hay diferentes estrategias para descubrir moléculas bioactivas, el usar la información bioquímica, farmacológica y química de manera racional es lo más adecuado. Para esto se necesita contar con un bioensayo (*screening*), para determinar *in silico*, *ex vivo*, *in vitro*, *in vivo* o la colección de todos estos, llamados ensayos *in combo* (Navarrete-Vázquez et al., 2013; Colín-Lozano et al., 2018, 2022), si los compuestos análogos tienen o no la actividad biológica deseada, así como su potencia relativa en concordancia con un fármaco control.

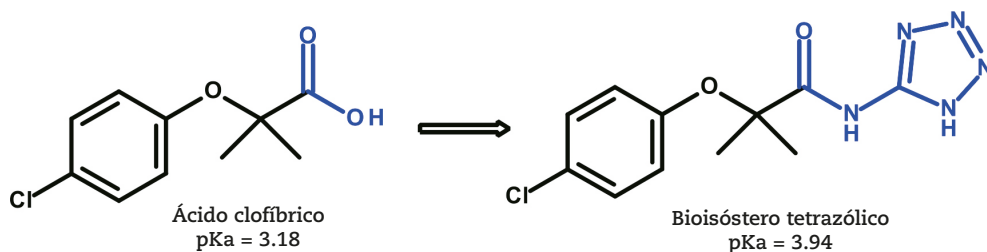


Figura 3. Reemplazo bioisotérico no clásico: El ácido clofibrato es el metabolito activo del clofibrato, un profármaco agonista PPAR α , utilizado para reducir los niveles plasmáticos de triglicéridos. Se diseñó y preparó el tetrazol mediante sustitución isostérica del ácido carboxílico (ya que comparten características de acidez similar). El análogo tetrazólico fue 2,5 veces más potente que el ácido clofibrato para inhibir a la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1), disminuyendo así los niveles séricos de glucosa en animales diabéticos debido a la reducción en la producción de cortisol (Navarrete-Vázquez *et al.*, 2013; Li, 2020: 266).

Uno de los criterios más utilizados en el diseño molecular racional es conocido como bioisosterismo (Buckle *et al.*, 2013). Los bioisósteros son grupos funcionales intercambiables y equivalentes en cuanto a su actividad farmacológica (Navarrete-Vázquez *et al.*, 2013). El bioisosterismo representa una estrategia para la modificación racional de moléculas líder, que implica un cambio en la lipofilia y el efecto estérico y electrónico de la molécula inicial (Meanwell, 2018). Estos cambios afectan la potencia, el transporte del compuesto hasta su sitio de acción, la interacción fármaco-receptor y bloquea o favorece el metabolismo (Figura 3).

El concepto de bioisótero es una buena guía para investigar la relación estructura química-actividad biológica (SAR), y muchos otros atributos relevantes de la similitud entre los fármacos (Navarrete-Vázquez *et al.*, 2013). Existen otras estrategias para la modificación molecular de compuestos líderes, como son: el diseño de análogos rígidos, la homologación y/o ramificación de cadenas alifáticas, los regioisómeros aromáticos, la formación de híbridos farmacofóricos, entre otras (Wermuth, 2015: 181-186).

1.7 Las tres fases de la acción de los fármacos

La forma en que un fármaco entra en el cuerpo, alcanza su blanco molecular y vuelve a salir del organismo, se puede dividir en tres fases distintas:

fase farmacéutica, fase farmacocinética y fase farmacodinámica (Wermuth, 2015: 7). Durante el desarrollo de un fármaco, las tres fases se investigan de forma interdependiente porque los cambios estructurales necesarios para una fase no deben anular la idoneidad en otra fase (Lipinski et al., 2001).

La fase farmacéutica: Los fármacos se aplican por vía oral (modo preferido) o parenteral (inyección subcutánea o intravenosa, por vía rectal o por inhalación). Una combinación de las habilidades de los farmacéuticos debe proporcionar el candidato a fármaco en formulaciones adecuadas. En el caso de las tabletas, la sustancia farmacéutica debe ser cristalina y no tener un punto de fusión bajo; para inyecciones, debe ser soluble en agua, por ejemplo, como sal. Las características estructurales requeridas deben ser compatibles con la actividad farmacológica (Delgado-Cirilo et al., 2003: 4).

La fase farmacocinética: se ocupa de lo que el cuerpo le hace a un fármaco, como los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). La solubilidad suficiente en medio acuoso para la absorción y el transporte a través de sangre, debe combinarse con una lipofilidad suficiente para el paso a través de las membranas celulares (Avendaño, 2004: 157-159). Estas propiedades fisicoquímicas van a determinar su capacidad para permear las membranas biológicas, unirse a proteínas séricas y, finalmente, a sitios de acción específicos para ejercer su acción antes de sufrir su biotransformación metabólica, eliminación o ambas. Los procesos ADME se definen brevemente como:

Absorción (A): es el mecanismo por el cual el fármaco llega al torrente sanguíneo. La vía de administración específica (oral, intraperitoneal, intramuscular, etc.) afecta directamente este parámetro (Dunlap y Hury, 2018: 120).

Distribución (D): es el proceso a través del cual el fármaco se reparte desde el torrente sanguíneo a varios compartimentos del cuerpo, incluidos tejidos, cerebro y otros órganos.

Metabolismo (M): es la biotransformación química que sufre una sustancia dentro del cuerpo, con el fin de hacerla más soluble en agua para su posterior eliminación. Este proceso normalmente ocurre en el hígado y otros órganos como el riñón y el intestino, mediado por la participación de complejos enzimáticos de monooxigenasas de función mixta, llamados

citocromos P450 (Dunlap y Hurn, 2018: 120-122). Se divide principalmente en dos fases: las reacciones de fase I (oxidación, reducción e hidrólisis), y las reacciones de fase II: conjugación con moléculas endógenas solubles en agua: glucuronidación, sulfatación, conjugación con glutatión (Silverman y Holladay, 2014: 357-403).

Excreción (E): es el proceso de eliminación de sustancias del cuerpo, ya sea en su forma intacta o metabolizada; estas sustancias se remueven de la circulación sanguínea ya sea por vía renal (orina), fecal (heces), pero también a través de otros fluidos como pueden ser la saliva, el sudor, las lágrimas e incluso la exhalación (Dunlap y Hurn, 2018: 124-129).

Cuando un compuesto bioactivo es demasiado hidrófilo y al mismo tiempo contiene un grupo de ácido carboxílico, por ejemplo, la conversión en un éster simple facilitará la absorción en forma de profármaco. Una vez en la sangre, las esterasas inespecíficas catalizarán el metabolismo hidrolítico a la forma de ácido carboxílico activo (Navarrete-Vázquez *et al.*, 2013). Esta forma ácida se unirá con la proteína sanguínea llamada albúmina para su distribución. A mayor unión a proteínas sanguíneas, menor será la distribución del fármaco. Sólo la especie libre puede llegar al sitio de acción farmacológico, metabolizarse y/o excretarse (Nogrody y Weaver, 2005: 146-156). Las sustancias farmacológicas deben permanecer activas y en el cuerpo un tiempo no demasiado breve, ni demasiado largo. Para muchos fármacos, se busca una tasa metabólica y / o de excreción que permita la dosificación “una vez al día”. A veces, esto requiere la identificación de sitios en la molécula que se metabolizarán rápidamente con la pérdida de actividad concomitante.

La fase farmacodinámica: se ocupa de lo que el fármaco le hace al organismo, es decir, de dilucidar los detalles mecánicos de la interacción del fármaco con su sitio de acción a nivel molecular. Usualmente, los fármacos interactúan con sus dianas farmacológicas, que pueden ser de naturaleza proteica (receptores de membrana, enzimas, canales iónicos, etc.), ácidos nucleicos (DNA, RNA), carbohidratos de superficie o lípidos (Silverman y Holladay, 2014: 123). Esta formación del complejo fármaco-sitio diana mediante enlaces débiles, como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals, genera la respuesta biológica (Delgado-Cirilo *et al.*, 2003: 29).

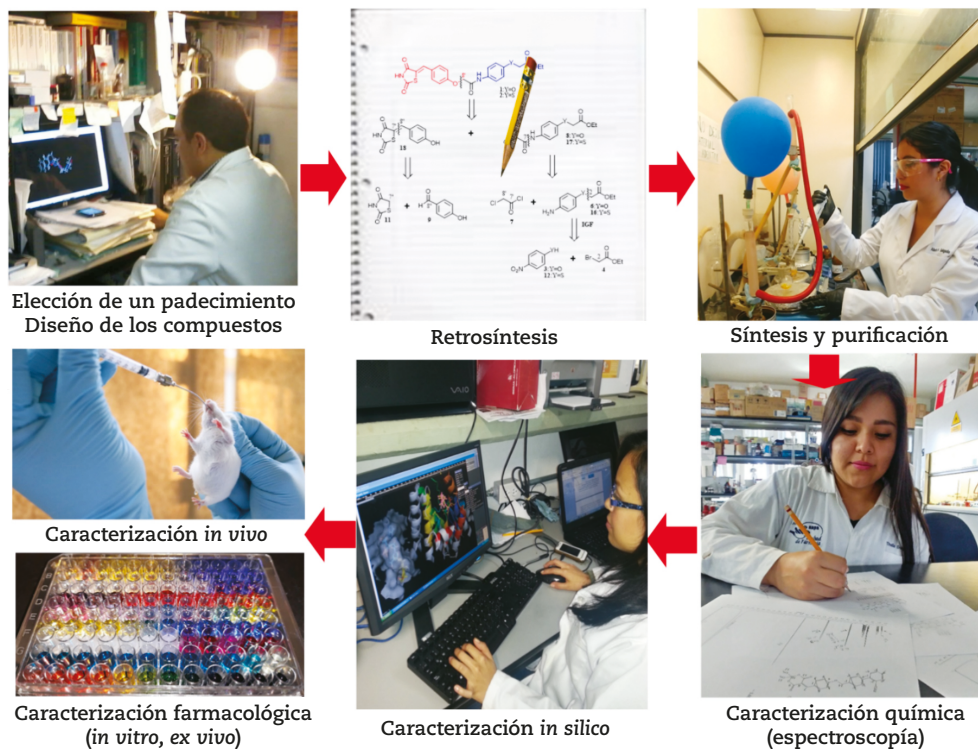


Figura 4. Ciclo de la química farmacéutica.

El diseño de moléculas bioactivas y el desarrollo de fármacos (química farmacéutica) es un proceso complejo, que se puede representar en la Figura 4.

El proceso comienza al conocer la bioquímica de la enfermedad a tratar, elegir un *target* adecuado y diseñar racionalmente la molécula objetivo, evitando el uso de toxicóforos y PAINS (moléculas que actúan como falsos positivos en los bioensayos). Posteriormente se realizan biosimulaciones predictivas, mientras que se sintetizan las moléculas diseñadas, previa retrosíntesis, se realiza la purificación y caracterización química para ver la identidad de la molécula usando RMN, masas, IR, e incluso Rayos-X (Domínguez-Mendoza et al., 2021). Los compuestos puros son sometidos a varios bioensayos para validar las predicciones farmacológicas *in silico* (Wermuth, 2015: 143). Una vez identificados los compuestos activos, con propiedades

biofarmacéuticas aceptables y poco riesgo de toxicidad, se someten a otras evaluaciones preclínicas de interés (Domínguez-Mendoza *et al.*, 2021).

1.8 Biosimulación predictiva

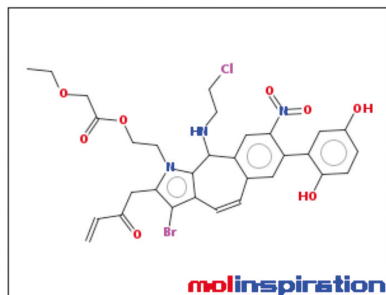
A través del enfoque de biosimulación, el largo y costoso proceso que requiere el desarrollo de un fármaco se podría reducir bastante, disminuyendo también el número de animales de laboratorio y / o personas utilizadas en la experimentación. La biosimulación predictiva es una disciplina relativamente nueva, que utiliza métodos avanzados de la investigación para describir y explorar los sistemas biológicos utilizando modelos quimio- y bioinformáticos (Wermuth, 2015: 143-149).

El modelo de simulación traduce los conocimientos sobre el sistema biológico en ecuaciones matemáticas. En una fase inicial del proceso de descubrimiento de moléculas bioactivas, se puede utilizar el modelo de biosimulación predictiva para probar cualquier hipótesis y cambiar el producto con el fin de optimizar la función, o para calcular la probabilidad de que un agente determinado funcione como fármaco, incluso antes de que se sintetice la primera molécula. Durante la fase de pruebas se puede utilizar el modelo de biosimulación, como un vehículo para definir un protocolo de pruebas eficaz y comprobar que la información obtenida de los experimentos sea coherente (Dunlap y Huryn, 2018: 40).

En este contexto, para el diseño racional de compuestos con potencial acción terapéutica, se deben considerar ciertos parámetros fisicoquímicos, que se han establecido como reglas básicas para aumentar la probabilidad de que las moléculas propuestas muestren una buena permeabilidad y, por ende, una adecuada biodisponibilidad tras su administración por vía oral. El primer paso de la biosimulación predictiva será que las moléculas diseñadas pasen el filtro de las reglas de Lipinski, o la regla del #5, que consta de cuatro parámetros que se enlistan a continuación (Lipinski *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002):

- Un peso molecular menor a 500 g/mol.
- Un valor de lipofilidad, expresado como logP menor a 5.
- Un número de donadores de puente de hidrógeno menor a 5.
- Un número de aceptores de puentes de hidrógeno menor a 10.

miSMILES: C=CC(=O)Cc4c(Br)c3C=Cc2cc(c1cc(O)ccc1O)c(N(=O)=O)cc2C(NCCCCI)c3n4CCOC(=O)COCC



[Molinspiration_property_engine](#) v2018.10

mlogP	5.50
TPSA	155.85
natoms	44
Mw	688.96
nON	11
nOHNH	3
nviolations	3
nrotb	15
volume	546.66

Figura 5. Interfaz del servidor en línea molinspiration.

Para refinar un poco más, esta regla fue complementada con algunas extensiones adicionales en las cuales se consideran los siguientes criterios:

- 10 o menos enlaces rotables en la molécula.
- Área de superficie polar (TPSA) menor a 120 Å², para una buena absorción gastrointestinal; y 60-90 Å² para una buena permeabilidad en la barrera hematoencefálica.
- El número de átomos total debe estar entre 20 y 70.
- Al menos un anillo aromático en la estructura.

Para evaluar estos parámetros y evitar violaciones a las reglas, se puede hacer uso del portal quimiinformático Molinspiration (Figura 5), el cual se encuentra libre para su uso en la dirección (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) y cuenta con varias herramientas de análisis, así como la posibilidad de usarlo a través de códigos SMILES (por sus siglas en inglés: Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

1.8.1 Ensayos in silico: Predicciones farmacodinámicas

SwissTargetPrediction

Es una herramienta web disponible en (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), que tiene como objetivo predecir las dianas terapéuticas proteicas más

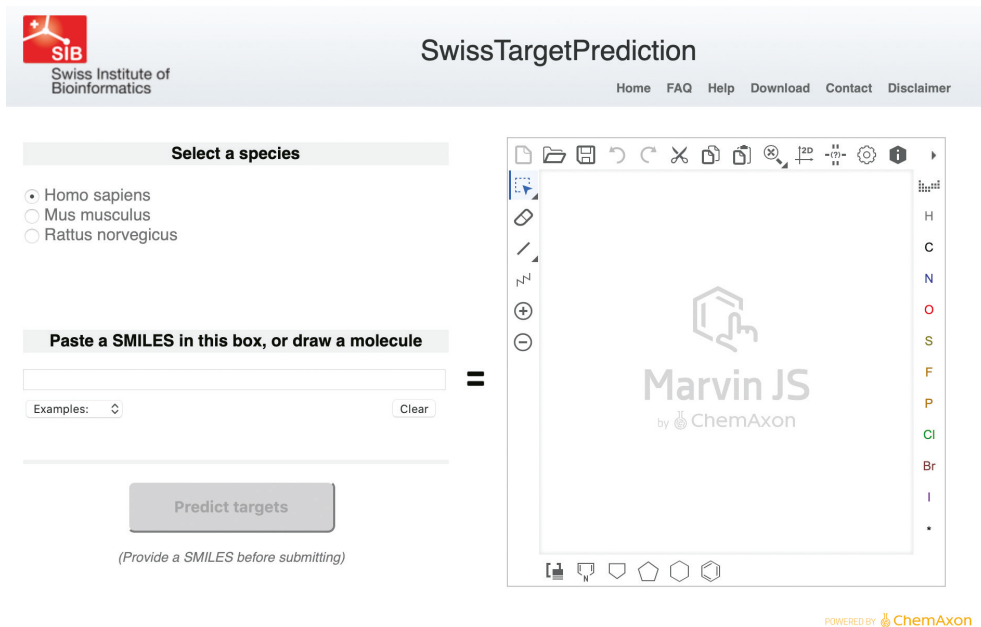


Figura 6. Interfaz del servidor en línea SwissTargetPrediction.

probables de moléculas sintéticas pequeñas (Figura 6). Las predicciones se basan en el principio de similitud, mediante el cribado inverso, y se realizan mediante la búsqueda de moléculas similares, en 2D y 3D, dentro de una colección de más de 376 342 compuestos que se sabe son activos experimentalmente en un conjunto extendido de 3 068 dianas macromoleculares (Daina et al., 2019).

PASS Online

PASS (Predicción de espectros de actividad para sustancias) es una herramienta quimioinformática, disponible en línea (<http://www.way2drug.com/PASSOnline>), que predice posibles efectos tanto farmacológicos como tóxicos, basándose en la relación estructura/actividad de compuestos ya reportada en la literatura. Esta predicción está dada por un análisis de la similitud por fragmentos del compuesto ingresado al sistema, con aquellos que ya han sido reportados y que presentan cierta actividad biológica (Filimonov et al., 2014).

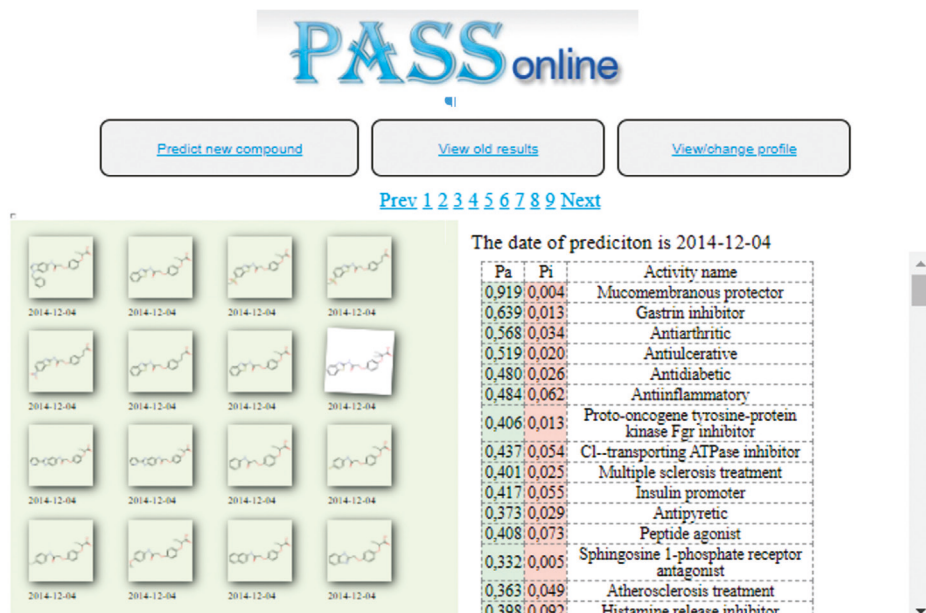


Figura 7. Interfaz del servidor en línea PASSOnline.

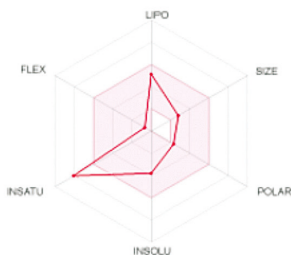
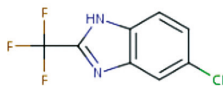
Los resultados arrojados por este servidor consisten en una lista de diferentes actividades biológicas organizadas de mayor a menor en función de P_a , el cual indica la probabilidad, de que el compuesto presente la actividad en cuestión. Valores de $P_a > 0.7$ indican una buena probabilidad, mientras que valores de P_a entre 0.5 a 0.7 indican una probabilidad mediana y, por último, valores por debajo de 0.5 indican una probabilidad más bien discreta de presentarla. Complementando esta información, también se genera un valor P_i que indica la probabilidad de que el compuesto sea inactivo. Por lo tanto, PASS se puede utilizar para estimar los perfiles de actividad biológica de moléculas virtuales, antes de su síntesis química y prueba biológica (Filimonov et al., 2014).

1.8.2 Predicciones farmacocinéticas

Swiss ADME

Este sitio web (<http://www.swissadme.ch/>) permite calcular descriptores físico-químicos, así como predecir los parámetros ADME, las propiedades

Molecule 1



SMILES Clc1ccc2c(c1)nc([nH]2)C(F)(F)F

Physicochemical Properties

Formula	C ₈ H ₄ ClF ₃ N ₂
Molecular weight	220.58 g/mol
Num. heavy atoms	14
Num. arom. heavy atoms	9
Fraction Csp ³	0.12
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	1
Molar Refractivity	46.11
TPSA	28.68 Å ²

Lipophilicity

Log <i>P</i> _{ow} (iLOGP)	1.53
Log <i>P</i> _{ow} (XLOGP3)	3.48
Log <i>P</i> _{ow} (WLOGP)	4.39
Log <i>P</i> _{ow} (MLOGP)	2.62
Log <i>P</i> _{ow} (SILICOS-IT)	3.62
Consensus Log <i>P</i> _{ow}	3.13

Water Solubility	
Log <i>S</i> (ESOL)	-3.81
Solubility	3.42e-02 mg/ml ; 1.55e-04 mol/l
Class	Soluble
Log <i>S</i> (Ali)	-3.76
Solubility	3.79e-02 mg/ml ; 1.72e-04 mol/l
Class	Soluble
Log <i>S</i> (SILICOS-IT)	-4.42
Solubility	8.37e-03 mg/ml ; 3.79e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	Yes
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log <i>K</i> _p (skin permeation)	-5.17 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 1 violation: #atoms<20
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	No; 1 violation: MW<250
Synthetic accessibility	1.48

Figura 8. Interfaz del servidor en línea SwissADME.

farmacocinéticas, la naturaleza similar a la de un fármaco y la compatibilidad con las reglas de química farmacéutica adecuada de una o varias moléculas pequeñas, para respaldar el descubrimiento de moléculas bioactivas y el desarrollo posterior de fármacos (Figura 8) (Daina et al., 2017).

admetSAR2

Es una herramienta de biosimulación en línea (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>), que permite llevar a cabo predicciones de las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de toxicidad de los compuestos ingresados a la base de datos (Figura 9). Este tipo de cribado es muy importante, debido a que muchos candidatos a fármaco no llegan al mercado debido a pobres perfiles farmacocinéticos y propiedades tóxicas inaceptables. Esto resulta

Figura 9. Interfaz del servidor en línea admetSAR2.

en un alto gasto de recursos, que podrían ser dirigidos al desarrollo de moléculas candidatas bien diseñadas desde un principio (Yang *et al.*, 2019).

PreADMET

Este sitio, al igual que el anterior, es una aplicación donde se pueden llevar a cabo predicciones farmacocinéticas, toxicológicas y de cuasifármaco. PreADMET se encuentra disponible para su libre uso en (<https://preadmet.bmdrc.kr/>). Éste realiza los cálculos basándose en descriptores moleculares en dos y tres dimensiones; incorpora tres rubros de análisis predictivos: el cálculo de propiedades como cuasi-fármaco, evaluación del perfil farmacocinético y evaluación del perfil toxicológico (Figura 10). Se incluye la inhibición de CYP450, así como de glicoproteína P; y en el perfil toxicológico se evalúa la probabilidad de bloqueo de canales hERG, genotoxicidad de AMES y probabilidad de carcinogenicidad en ratas y ratones (Lee *et al.*, 2013).

1.8.3 Detección de alertas toxicológicas

ACD / ToxSuite

El programa ACD / ToxSuite (<https://www.acdlabs.com/products/percepta-platform/tox-suite/>) comprende una colección de módulos de licencia de paga, creados para la predicción cuantitativa de algunos parámetros de

ID	Value
BBB	3.78114
Buffer_solubility_mg_L	7964.99
Caco2	24.3805
CYP_2C19_inhibition	Inhibitor
CYP_2C9_inhibition	Inhibitor
CYP_2D6_inhibition	Non
CYP_2D6_substrate	Weakly
CYP_3A4_inhibition	Inhibitor
CYP_3A4_substrate	Non

Figura 10. Interfaz del servidor en línea PreADMET.

evaluación básica de la toxicidad aguda. Ésta se lleva a cabo mediante la relación estructura-actividad de las moléculas a analizar, comparada con la actividad biológica asociada a fragmentos pertenecientes a la base de datos de este programa, con lo cual se obtienen como resultados valores numéricos para pruebas como:

- Dosis letal media (DL_{50}), el cual es un indicador de la toxicidad aguda de un compuesto (Madrigal-Angulo et al., 2022).
- Inhibición del citocromo P450, que indica el riesgo de que otros fármacos co-administrados no se metabolicen de manera adecuada, se bioacumulen y exista una potencial interacción tóxica entre ellos (Colín-Lozano et al., 2018).

ACD/Tox Suite

Batch Calculations
hERG Inhibitors
Trainable Models
P450 Inhibitors
Acute Toxicity
LD50
Categories
Hazards

Predicted Values - Lethal Dose (LD50, mg/kg)

CN1C=NC(=N)NC(=N)N1C

Metformin

Species/Administration route	LD50 (mg/kg)	Reliability (RI)
Mouse/Intraperitoneal	320	High(0.85)
Mouse/Oral	810	Moderate(0.64)
Mouse/Intravenous	83	Moderate(0.53)
Mouse/Subcutaneous	340	Moderate(0.59)
Rat/Intraperitoneal	220	Moderate(0.75)
Rat/Oral	960	Moderate(0.67)

Experimental Values for Similar Structures

Mouse/Intraperitoneal	Mouse/Oral	Mouse/Intravenous	Mouse/Subcutaneous	Rat/Intraperitoneal	Rat/Oral
<chem>CN1C=NC(=N)NC(=N)N1C</chem>	<chem>CN1C=NC(=N)NC(=N)N1C</chem>	<chem>CN1C=NC(=N)NC(=N)N1C</chem>	<chem>CN1C=NC(=N)NC(=N)N1C</chem>	<chem>CN1C=NC(=N)NC(=N)N1C</chem>	<chem>CN1C=NC(=N)NC(=N)N1C</chem>
Exact match Biguanide, 1,1-dimeth.. CAS: 657-24-9 LD50: 247 mg/kg Similarity index: 1.00	Biguanide, 1-isopropy.. CAS: 4762-14-5 LD50: 450 mg/kg Similarity index: 0.98	Biguanide, 1-methyl-.. CAS: 1674-62-0 LD50: 470 mg/kg Similarity index: 0.98	Biguanide, 1-isobutyl-.. CAS: 924-84-5 LD50: 250 mg/kg Similarity index: 0.98	Biguanide, 1-sec-butyl-.. CAS: 4762-16-7 LD50: 260 mg/kg Similarity index: 0.98	

Figura 11. Interfaz del software ACD / Tox Suite.

- Bloqueo de canales hERG (human Ether-a-go-go-Related Gene), los cuales se encuentran en el corazón y cuyo bloqueo provoca el síndrome del alargamiento de la onda QT, que se traduce como el retardo de la repolarización de los ventrículos resultando en arritmias cardíacas (Colín-Lozano et al., 2022).

Estos resultados son útiles como criterio de selección al momento de invertir recursos en el desarrollo de moléculas propuestas, criterio que forma parte del análisis consenso farmacológico (Domínguez-Mendoza et al., 2021).

Análisis de consenso farmacológico

La selección de un candidato para ser priorizado en su síntesis o evaluación farmacológica *in vitro* o *in vivo*, se basa en un análisis de consenso farmacológico (Domínguez-Mendoza et al., 2021), el cual combina los resultados de diferentes cálculos realizados *in silico*. Este análisis se compone de.

- Predicciones farmacodinámicas

- Predicciones farmacocinéticas
- Predicciones toxicológicas

El argumento del análisis de consenso farmacológico es que cuantos más cálculos coincidan en que un compuesto es activo, con baja toxicidad y con un perfil farmacocinético adecuado, más confiable es la selección / discriminación de dicho compuesto bioactivo. Por lo tanto, un compuesto que presenta puntuaciones altas en una colección de predicciones farmacológicas, tiene mayor probabilidad de ser un buen inhibidor / agonista / antagonista en un ensayo biológico que un compuesto con una puntuación alta en una predicción única (Domínguez-Mendoza *et al.*, 2021). Esta propuesta se esquematiza con la Figura 12, donde se muestra cómo la optimización de todos los parámetros nos permite obtener moléculas con mayor potencial de ser utilizadas como fármacos (Czechitzky y Hamley, 2015).

En la Figura 13 se pueden resumir de forma adecuada las fases de descubrimiento de moléculas bioactivas y el inicio del desarrollo de un potencial fármaco (Huang y Aslanian, 2012: 417).

Es extremadamente importante remarcar que toda biosimulación predictiva debe validarse experimentalmente mediante el correspondiente ensayo biológico, como los que se presentan en los capítulos siguientes de esta obra.

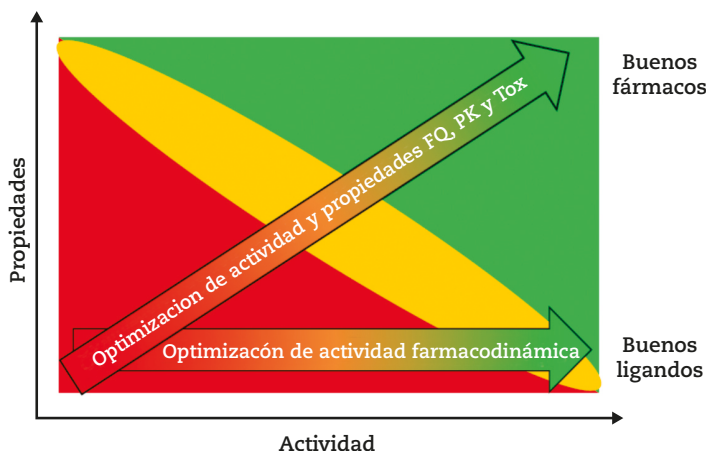


Figura 12. Optimización de un compuesto bioactivo (Kerns y Di, 2008).

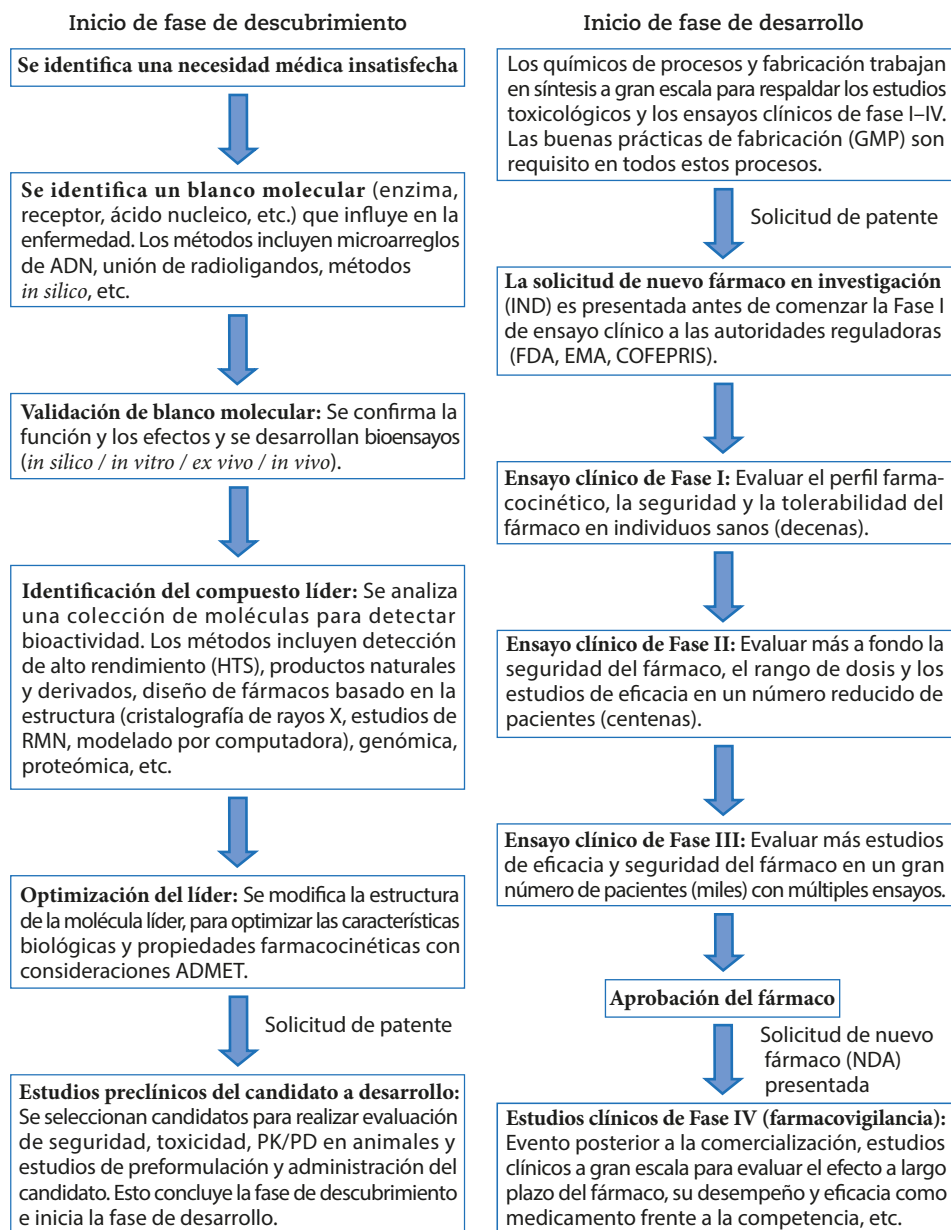


Figura 13. Paradigma en el descubrimiento de pequeñas moléculas bioactivas y el desarrollo de fármacos (modificado de Huang y Aslanian, 2012: 417).

Conclusiones

La química farmacéutica integra el diseño racional, las biosimulaciones predictivas, la síntesis química y la evaluación farmacológica de sustancias bioactivas con potencial uso en la terapéutica de enfermedades. Esta área, cuyos cimientos están basados en la farmacología (farmacocinética y farmacodinamia) y la química orgánica, se encuentra en desarrollo y es un campo fértil en nuestro país, siendo atractiva para estudiantes de licenciatura y posgrado, al mismo tiempo que genera recursos humanos de alto nivel con visión académica e industrial en el campo de la Farmacia.

Si bien el desarrollo de un fármaco es un proceso complejo, largo y costoso, que en muchas ocasiones no produce los resultados esperados, la importancia del buen manejo de términos, del conocimiento farmacéutico y químico, así como el apego a normas éticas, contribuirá de forma relevante en el tratamiento y prevención de enfermedades que aquejan a nuestra población. Así, la selección adecuada de un bioensayo (*in vitro*, *ex vivo*, *in silico*, *in vivo* o *in combo*) será una parte fundamental en la investigación de nuevos compuestos bioactivos de origen sintético y/o natural.

Referencias

- Allen Jr., L. V. (2013). *Remington: An introduction to Pharmacy*. Primera edición. Pharmaceutical Press, Londres.
- Avendaño, C. (2004). *Introducción a la Química Farmacéutica*. Segunda edición. McGraw-Hill, Madrid.
- Brailowsky, S. (2002). *Las sustancias de los sueños. Neuropsicofarmacología*. Tercera edición. Fondo de Cultura Económica, México.
- Buckle, D. D., Erhardt, P. W., Ganellin, C. R. (2013). Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC Recommendations). *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Volume 48: 387-418. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417150-3.00024-7>.
- Chang, R. (2018). *Chemistry*. Décimo tercera edición. McGraw-Hill, Nueva York.
- Colín-Lozano, B., Estrada-Soto, S., Chávez-Silva, F., Gutiérrez-Hernández, A., Cerón-Romero, L., Giacomani-Martínez, A., Almanza-Pérez, J. C., Hernán-

dez-Núñez, E., Wang, Z., Xie, X., Cappiello, M., Balestri, F., Mura, U., Navarrete-Vázquez, G. (2018). Design, Synthesis and in Combo Antidiabetic Bioevaluation of Multitarget Phenylpropanoic Acids. *Molecules* 23(2): 340. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23020340>.

Colín-Lozano, B., Torres-Gómez, H., Hidalgo-Figueroa, S., Chávez-Silva, F., Estrada-Soto, S., Almanza-Pérez, J. C., Navarrete-Vázquez, G. (2022). Synthesis, In Vitro, In Vivo and In Silico Antidiabetic Bioassays of 4-Nitro(thio)phenoxyisobutyric Acids Acting as Unexpected PPAR γ Modulators: An In Combo Study. *Pharmaceuticals (Basel)* 15(1): 102. doi: <https://doi.org/10.3390/ph15010102>.

Czechitzky, W. y Hamley, P. (2015). *Small Molecule Medicinal Chemistry: Strategies and Technologies*. Primera edición. Wiley, Nueva York.

Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7: 42717. doi: <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research*, 47: w1, w357-w364. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>.

Delgado-Cirilo, A., Minguillon-Llombart, C., Joglar-Tamargo, J. (2003). *Introducción a la química terapéutica*. Segunda edición. Ediciones Díaz de Santos, Madrid.

Domínguez-Mendoza, E. A., Galván-Ciprés, Y., Martínez-Miranda, J., Miranda-González, C., Colín-Lozano, B., Hernández-Núñez, E., Hernández-Bolio, G. I., Palomino-Hernández, O., Navarrete-Vázquez, G. (2021). Design, synthesis, and in silico multitarget pharmacological simulations of acid bioisosteres with a validated in vivo antihyperglycemic effect. *Molecules*, 26(4): 799. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26040799>.

Dunlap, N. K. y Hury, D. M. (2018). *Medicinal Chemistry*. Primera edición. CRC Press, Taylor & Francis Group, Nueva York.

- Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Gloriovova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D. S., Pogodin, P. V., Poroikov, V. V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(3): 444-457. doi: <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>.
- Gillespie, P. y Goodnow Jr., R. A. (2004). The hit-to-lead process in drug discovery. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 39: 293-304. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(04\)39022-6](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(04)39022-6).
- Huang, X. y Aslanian, R. G. (2012). *Case studies in modern drug discovery and development*. Primera edición. John Wiley & Sons, Nueva Jersey.
- Kerns, E. y Di, L. (2008). *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. Segunda edición. Academic Press, Londres.
- Korolkovas, A. (2011). *Essentials of Medicinal Chemistry*. Segunda edición. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Lee, S. K., Lee, I. H., Kim, H. J., Chang, G. S., Chung, J. E., No, K. T. (2013). The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties (pp. 418-420). *EuroQSAR 2002, Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions*. Blackwell Publishing, Massachusetts.
- Ley General de Salud. (http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf).
- Li, J. J. (2020). *Medicinal Chemistry for practitioners*. Primera edición. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Review*, 46(1-3): 3-26. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
- Madrigal-Angulo, J. L., Ménez-Guerrero, C., Estrada-Soto, S., Ramírez-Espinoza, J. J., Almanza-Pérez, J. C., León-Rivera, I., Hernández-Núñez, E., Aguirre-Vidal, Y., Flores-León, C. D., Aguayo-Ortíz, R., Navarrete-Vázquez, G. (2022). Synthesis, in vitro, in silico and in vivo hypoglycemic and lipid-lowering effects of 4-benzyloxy-5-benzylidene-1,3-thiazolidine-2,4-diones mediated

by dual PPAR α/γ modulation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 70: 128804. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128804>.

Mata Essayag, R. (2000). *Curso Teórico de Farmacognosia*. Segunda versión. Facultad de Química, UNAM, México.

Meanwell, N. A. (2018). Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61: 5822-5880. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788>.

Navarrete-Vázquez, G., Alaniz-Palacios, A., Hidalgo-Figueroa, S., González-Acevedo, C., Ávila-Villarreal, G., Estrada-Soto, S., Webster, S. P., Medina-Franco, J. L., López-Vallejo, F., Guerrero-Álvarez, J., Tlahuext, H. (2013). Discovery, synthesis and in combo studies of a tetrazole analogue of clofibrilic acid as a potent hypoglycemic agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(11): 3244-3247. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.122>.

Nogady, T. y Weaver, D. (2005). *Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach*. Tercera edición. Oxford University Press, Londres.

Silverman, R. B. y Holladay, M. W. (2014). *The organic chemistry of drug design and drug action*. Tercera edición. Academic Press-Elsevier, San Diego.

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.*, 45(12): 2615-2623. doi: <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.

Wermuth, C. G. (2015). *The practice of medicinal chemistry*. Cuarta edición. Academic press, Londres.

Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations, 1998). *Pure Appl. Chem.* 70: 1129-1143. doi: <http://dx.doi.org/10.1351/pac199870051129>.

Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., Li, W., Liu, G., Tang, Y. (2019). admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical AD-MET properties. *Bioinformatics*, 35(6): 1067-1069. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty7007>.

Capítulo 2.

Introducción a los métodos analíticos para el desarrollo de moléculas bioactivas

Gabriela María Ávila Villarreal*,**
Candy Andreína Montaña Pérez*,**
Guadalupe Yáñez Ibarra*,**

* Unidad Especializada en I+D+i en Calidad de Alimentos y Productos Naturales, Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, A. C.

** Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit.

2.1 Introducción

La investigación para el descubrimiento de moléculas bioactivas y su posterior desarrollo como fármacos es, sin lugar a dudas, una tarea multidisciplinaria. En ella, la inclusión de métodos analíticos representa un papel importante y fundamental para dirigir adecuadamente la búsqueda e identificación de nuevos compuestos, no solo en el proceso de aislamiento e identificación, sino en todas las etapas de este proceso hasta la obtención del fármaco. De manera eventual, será necesario contar con metodologías analíticas para su cuantificación e identificación en matrices biológicas, obteniendo así información valiosa (Atanasov *et al.*, 2015). Este complejo proceso comienza con la selección de la enfermedad o el órgano blanco al que será dirigida la molécula en desarrollo.

En el proceso de identificación y búsqueda de la molécula idónea se pueden utilizar diversas estrategias, desde la síntesis o semisíntesis de la molécula, hasta la búsqueda de ésta a partir de fuentes naturales con un fundamento etnofarmacológico (Atanasov *et al.*, 2015; Cragg y Newman, 2013; Galloway *et al.*, 2010). En todas las etapas de desarrollo la aplicación de métodos analíticos adecuados nos permitirá dar seguimiento a la molécula, en la búsqueda de su distribución en el organismo y posibles tejidos blanco. Este proceso se describe gráficamente en la Figura 1, en la parte superior de la misma se ejemplifica el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos, ligado a algunos métodos analíticos de empleo común para su seguimiento.

En este contexto, una vez que es identificado el blanco biológico, es necesario comenzar los ensayos dirigidos, utilizando las moléculas con potencial actividad biológica sobre el blanco terapéutico de estudio.

A la par, el desarrollo en conjunto de metodologías de detección y caracterización de estas moléculas de manera independiente, resulta fundamental para la integración de estrategias de investigación, innovación y desarrollo con posibilidad de convertirse en procesos productivos masivos y escalables, en el caso de descubrir o diseñar una molécula con potencial uso en la terapéutica (Goodacre *et al.*, 2004).

En el caso particular de la Figura 1, la adecuada selección de métodos analíticos para la identificación, seguimiento y cuantificación, dependerá de



Figura 1. Proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos y los métodos analíticos involucrados. Muestra de la integración de modelos de bioensayo en la aplicación de métodos convencionales de separación cromatográfica, y su posible vinculación con métodos analíticos como cromatografía de líquidos y resonancia magnética nuclear.

las características químicas de la molécula (Atanasov *et al.*, 2015; Goodacre *et al.*, 2004). Dentro de éstos, la aplicación de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), a pesar de ser idónea, requiere equipamiento y mantenimiento de alta especialidad y costo, además de ser indispensable el consumo constante de gases para mantener en refrigeración los imanes superconductores, lo cual se logra a través del empleo de helio, un gas noble que es un recurso no renovable, lo que hace más restrictivo el empleo de estas técnicas (Chatham y Blackband, 2001).

Dentro de las técnicas analíticas más utilizadas, tenemos la cromatografía que se basa en el principio de separación de componentes a través de una fase móvil y una fase estacionaria; dichas técnicas ofrecen ventajas para el proceso de investigación. Por ejemplo, la cromatografía en capa fina (CCF) es el primer método cromatográfico utilizado para determinar perfiles de extractos de fuentes naturales, permite dar seguimiento a la formación de productos de síntesis y permite observar una diversidad de compuestos de distinta naturaleza. Resulta ser un método fácil, rápido, de bajo costo y reproducible, por mencionar algunas de sus ventajas, de manera que en la actualidad aún está en uso (Santiago y Strobel, 2013; Vervoort *et al.*, 2021).

En un sentido más estricto, los procesos automatizados son los que ofrecen resultados más confiables, razón por la cual las dos principales técnicas

analíticas utilizadas en las últimas décadas son la cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) y la cromatografía de líquidos (LC, por sus siglas en inglés), ambas acopladas a distintos detectores que hacen de estas técnicas una excelente opción para la identificación y cuantificación de moléculas bioactivas (Vervoort et al., 2021). Así, por ejemplo, la cromatografía de gases se puede acoplar a detectores como la espectrometría de masas (MS), de ionización de llama (FID), de captura de electrones (ECD), de quimioluminiscencia (CLD), de fotoionización (PID), todos por sus siglas en inglés (Martyr y Plint, 2012).

En el caso de la cromatografía de líquidos se tienen la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la de líquidos de ultra resolución (UPLC), ambas se pueden acoplar a detectores como el de índice de refracción (RI, por sus siglas en inglés), de absorbancia (UV-Vis), de fluorescencia, electroquímico, de espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) y de arreglo de diodos (De la Rosa et al., 2019; De Paiva et al., 2020; LaCourse, 2000; Lu et al., 2014). Debido a la versatilidad de dichas técnicas, se pueden identificar diferentes grupos funcionales, al utilizar diferentes fases estacionarias con características químicas en específico (Astefanei et al., 2017). Las principales y más utilizadas técnicas en la actualidad se describen en la Tabla 1.

Una de las principales ventajas al utilizar técnicas de cromatografía de líquidos frente a la cromatografía de gases es que a diferencia de ésta, no tenemos la limitante de que las moléculas de estudio preferentemente deben tener la capacidad de volatilizarse (Vervoort et al., 2021).

Tabla 1. Comparación de principales técnicas utilizadas en el análisis de moléculas bioactivas.

Técnica	Ventajas	Limitaciones del método	Referencias
UPLC	Acorta el tiempo de análisis hasta nueve veces en comparación con la HPLC, lo anterior se obtiene por la disminución del tamaño de partículas (2 µm) utilizado para el empaquetamiento de columnas.	El tamaño inferior de partícula genera contrapresiones más altas, que conllevan a una disminución de la vida útil de las columnas.	(Chawla y Ranjan, 2016; Nováková et al., 2006)

(Continúa)

Tabla 1. Comparación de principales técnicas utilizadas en el análisis de moléculas bioactivas (continuación).

Técnica	Ventajas	Limitaciones del método	Referencias
UPLC (cont.)	- El tamaño de partículas utilizado en sus columnas genera altas presiones (100 Mpa) y no ejerce un efecto negativo en los componentes del sistema. - Puede aumentar la resolución y sensibilidad en comparación con HPLC. - Disminuye el consumo de disolventes. - Puede acoplarse a diferentes tipos de detectores como fluorescencia, UV visible, índice de refracción, espectrometría de masas, entre otros. - Es una técnica cuantitativa.	- Las partículas de un tamaño inferior a 2 μm son en su mayoría no regenerables. - Es costoso en comparación con otras técnicas como CCF.	
HPLC	- Es más rápida, eficiente y precisa, en comparación con CCF. - Es aplicable para diversos tipos de analitos, como moléculas orgánicas, iones, moléculas y polímeros. - Tiene un alto poder de separación de analitos. - Puede acoplarse a diferentes tipos de detectores como fluorescencia, UV visible, índice de refracción, espectrometría de masas, entre otros. - Su funcionamiento es automatizado, por lo que permite un funcionamiento flexible y personalizable. - Es una técnica cuantitativa.	- No cuenta con un detector universal ideal. - Tiene una menor eficiencia de separación de analitos, en comparación con UPLC y CG. - Requiere de un mayor tiempo de análisis y gasto de solventes, en comparación con UPLC. - Su uso puede ser complicado para personas con falta de experiencia.	(Dong, 2013)
CG	Tiene una alta sensibilidad, especificidad y resolución, lo que permite una excelente separación de compuestos volátiles.	Requiere temperaturas elevadas para obtener perfiles de picos pronunciados y ampliar el rango de aplicación.	(Piechocka et al., 2020; Schomburg, 1979)

(Continúa)

Tabla 1. Comparación de principales técnicas utilizadas en el análisis de moléculas bioactivas (continuación).

Técnica	Ventajas	Limitaciones del método	Referencias
CG (cont.)	• Es idónea para el análisis de compuestos volátiles. • Tiene una alta reproducibilidad y precisión. • El tiempo que se requiere para la separación de metabolitos puede ser menor, en comparación con otras técnicas cromatográficas. • Se requiere una cantidad pequeña de muestra para su análisis. • Puede acoplarse a diversos detectores como espectrofotómetro de masas, ionización a la llama, conductividad térmica, captura de electrones.	• Tiene límites de detección bajos en alta resolución si no se aplican temperaturas elevadas. • Las altas temperaturas pueden estar limitadas, ya que afectan la fase estacionaria, móvil y solutos de análisis. • Su campo de aplicación se encuentra limitado a compuestos volátiles y termoes- tables. • Los detectores que utiliza son destructivos, de modo que no se puede recuperar la muestra, a excepción de MS. • No se puede modificar su FM, las modificaciones solo pueden dirigirse a la temperatura de columna y el horno.	
IR	• Es una técnica cualitativa y cuantitativa. • El análisis de la muestra no repercute en su integridad, no es destructiva. • La muestra no requiere de procesamiento. • No se requieren grandes cantidades de muestra para su análisis. • Es una técnica rápida para la detección de metabolitos y para el procesamiento de los datos. • A diferencia de CG es una técnica versátil, puede utilizarse para el análisis de muestras en diferentes estados de la materia (sólido, líquido y gas).	• No se puede utilizar para muestras que contengan agua, debido a que esta última absorbe de forma considerable la luz IR. • Puede ser necesario más de un espectro de IR para la identificación del compuesto, por lo que se requiere de otros métodos de espectroscopía, como MS y RMN. • Su uso para el análisis cuantitativo puede verse limitado por las bajas o altas concentraciones del compuesto.	(Jamró-giewicz, 2012; Shao et al., 2010; Yin et al., 2019)

Tabla 2. Principales bases de datos de acceso libre para la búsqueda e identificación de fragmentos de masas.

Base de datos	Sitio web	Descripción
ChemSpider	http://www.chemspider.com	Base de datos libre de estructuras químicas que proporciona acceso rápido a búsqueda de texto y estructuras, con más de 100 millones de estructuras de cientos de fuentes de datos. Proporciona información sobre fisicoquímica, bioactividad y propiedades espectrales de masas de metabolitos conocidos, útil para procesos de identificación química.
METLIN	https://metlin.scripps.edu/	La versión de acceso educativo libre de esta base de datos, de espectrometría de masas en tándem de alta resolución, contiene información sobre 1 millón de compuestos que incluyen lípidos, aminoácidos, carbohidratos, toxinas y productos naturales.
Human Metabolome Database (HMDB)	https://hmdb.ca/	Es una base de datos gratuita de metabolitos humanos, aunque también incluye metabolitos secundarios a partir de productos naturales asociados al metabolismo humano. HMDB contiene datos químicos, clínicos y de biología molecular de más de 100,000 metabolitos, incluidos componentes y aditivos alimentarios. Para fines de caracterización química, HMDB permite consultar datos de espectrometría GC-MS y LC-MS, LC-MS-MS y RMN.
MassBank	https://massbank.eu/MassBank/	Base de datos libre y completa con datos adquiridos en HRMS, a través de sistemas GC-MS y LC-MS. MassBank incluye información sobre nombre, estructura, masa exacta, picos, pérdidas neutras de más de 11,000 compuestos. Además, tiene una herramienta de búsqueda por fuente de ionización (es decir, ESI, APCI, MALDI) y analizador de masas (es decir, Q-TOF, ITFT, TOF).
MetAlign	http://mzmine.github.io/	Es un software de código abierto para el procesamiento de datos de espectrometría de masas, con el enfoque principal en datos LC-MS. Se basa en la caja de herramientas original de MZmine, proporciona un software fácil de usar, flexible y fácilmente ampliable con un conjunto completo de módulos que cubren todo el flujo de trabajo de análisis de datos de LC-MS. Este software permite la identificación de metabolitos, relacionando la información con los fragmentos de masas disponibles en la base de datos.

La espectrometría de masas ha constituido una herramienta fundamental para identificar estructuras orgánicas. Además, es actualmente el detector más potente en cromatografía, dada la alta sensibilidad de la técnica, siendo capaz de detectar bajas concentraciones de analito, lo que permite estudiar las masas de átomos, moléculas y fragmentos de moléculas (Thomas, 2019).

Existe una diversidad de bases de datos y bibliotecas de espectros de masas disponibles, algunas cuentan con información de LC-MS y actualmente se pueden encontrar con información de espectros de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés). Las bases de datos resumidas en la Tabla 2 son aquellas en las que adicionalmente podemos encontrar información disponible específica de metabolitos vegetales y que pueden ser consultadas de manera gratuita (Vinaixa et al., 2016).

Seleccionar adecuadamente la técnica analítica acorde al proceso o secuencia de identificación de una molécula, puede dar como resultado la optimización del tiempo y los recursos. Existen tantas etapas en el método analítico que incluso los análisis más sencillos pueden presentar variaciones entre laboratorios, por lo que es fundamental integrar las evidencias obtenidas a través de varias técnicas, y observar las coincidencias entre la información aportada por cada técnica, con la finalidad de garantizar la reproducibilidad de la información (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2019; United Nations Office on Drugs and Crime, 2009).

2.2 Identificación de compuestos bioactivos en fuentes naturales

La diversidad estructural que poseen los productos naturales hace que la mayoría de las veces sean muestras complejas, y si consideramos la limitada cantidad de muestra que generalmente se obtiene a través de las técnicas de purificación, esto exige una selección rigurosa de las estrategias analíticas para poder identificar y caracterizar estructuralmente a la molécula, con base en las características de los grupos funcionales, método de extracción, búsqueda dirigida, matriz, entre otras (Atanasov et al., 2015; Lautié et al., 2020; Pauli et al., 2012). Por lo anterior es fundamental integrar al contexto de estudio el origen del compuesto, clasificación botánica, sus antecedentes quimio-

taxonómicos, el cribado de pesos moleculares y modelo biológico utilizado (Atanasov *et al.*, 2015; Cragg y Newman, 2013; Kellogg *et al.*, 2019). En la Figura 2 se ejemplifica de manera general el proceso que se lleva a cabo.

Simultáneamente, se deben utilizar técnicas sencillas de detección que resultan ser un excelente apoyo en el proceso. En el caso de las etapas de separación y purificación de metabolitos, se puede hacer un seguimiento por cromatografía en capa fina, en donde se puedan utilizar placas cromatográficas con algún indicador de luz ultravioleta, para identificar los compuestos presentes en una mezcla determinada y establecer la pureza de

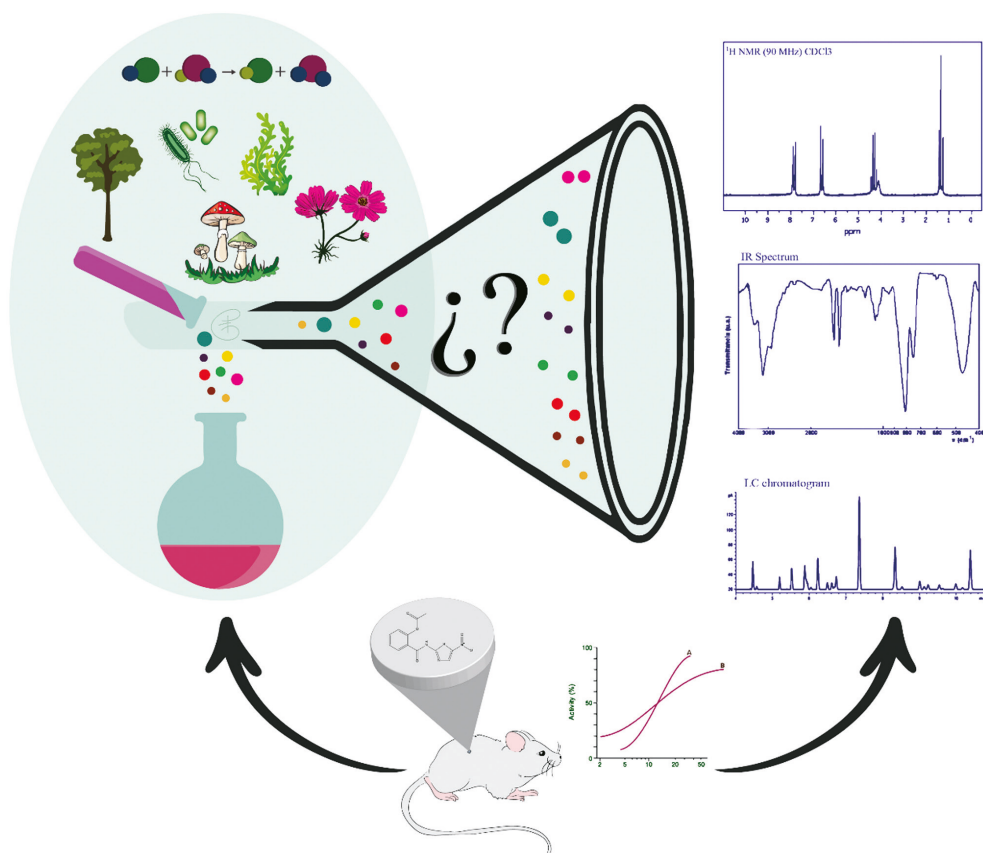


Figura 2. Incorporación de los métodos analíticos en la identificación y detección de compuestos en fuentes naturales y modelos biológicos.

una sustancia (Namir et al., 2019). De esta manera, se pueden aprovechar las características de emisión y absorción de los compuestos presentes en la muestra, y hacer una correlación con sus antecedentes químicos. Entonces, se tendrá una pauta para interpretar de una mejor manera los resultados instrumentales obtenidos (Bele y Khale, 2011; Urbain y Simões-Pires, 2020).

En la Figura 3 se muestra el análisis de un extracto vegetal que, como parte de su proceso de purificación por cromatografía en columna abierta, es fraccionado y analizado de manera preliminar por cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS). Una vez obtenidos los espectros y cromatogramas, éstos se pueden utilizar para la identificación de sus compuestos y usar dicha información para una posible purificación de los componentes mayoritarios presentes. Esto puede permitir una elucidación estructural posterior, con técnicas como Resonancia Magnética Nuclear, más eficiente, optimizando así los recursos y tiempos de utilización de equipos disponibles (Kellogg et al., 2019).

En el ejemplo de la Figura 3, se tenía el antecedente de la presencia de un triterpeno pentacíclico, ácido ursólico (AU), como uno de los componentes presentes en la planta (*Agastache mexicana*), y se deseaba corroborar su presencia en una muestra de reciente colecta. Se realizó una extracción líquido-líquido del material vegetal, y se observó por CCF en una fase móvil adecuada (una mezcla 9:1 diclorometano:acetato de etilo). Una vez observado el líquido a través de CCF, se presentó una mancha que por sus características de coloración y elución parecía ser AU. Para relacionar lo observado en la placa, se corroboró la presencia de la molécula a través de una búsqueda dirigida de la masa por detección en UPLC-MS. El peso molecular reportado para el compuesto del ejemplo es de 456.7 g/mol, y en un método de detección negativo se corroboró la presencia al encontrar la masa correspondiente a 455.38 Da. Con este sencillo ejemplo, se muestra la factibilidad de integrar un método analítico en los procesos.

Este ejemplo muestra cómo la incorporación de técnicas analíticas al estudio de muestras complejas, nos permite ir caracterizando los compuestos presentes, y resalta el aporte de la cromatografía en capa fina para dar un seguimiento rápido al proceso. Éste, al ligar la información, nos permite corroborar de una manera dirigida a través de la búsqueda de la masa

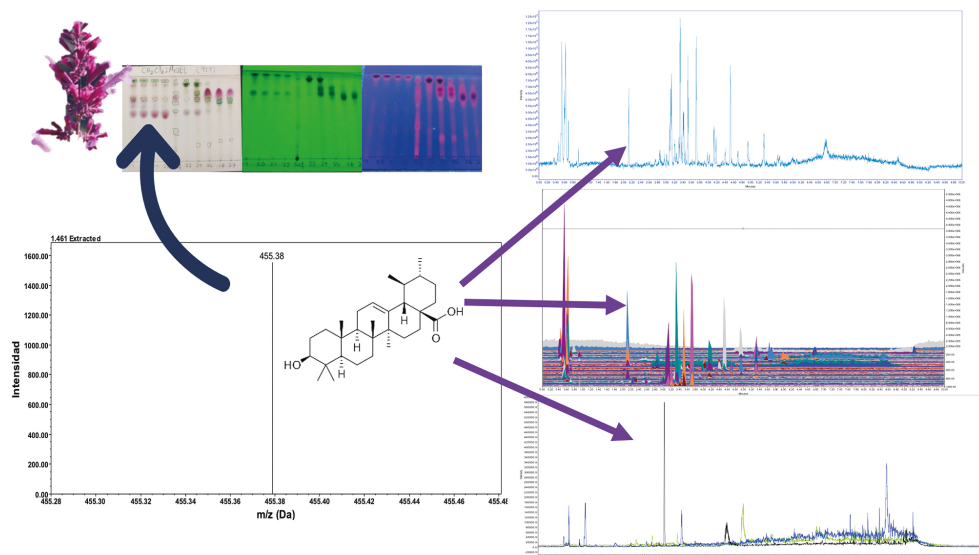


Figura 3. Caso de estudio donde se ejemplifica la presencia de un compuesto identificado por CCF, y su seguimiento por cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas.

molecular, la presencia de compuestos previamente reportados que pueden ser característicos para las especies de estudio. Además, es importante mencionar que integrar al proceso de identificación de compuestos, los métodos analíticos disponibles en conjunto, puede reflejar ahorros de tiempo, permitiendo así el desarrollo integral de procesos a gran escala.

2.3 Técnicas de cromatografía de líquidos acopladas a espectrometría de masas, para la evaluación de la composición química y la investigación en productos naturales: un panorama general

A lo largo del tiempo los productos naturales han contribuido al descubrimiento de fármacos como fuente de moléculas bioactivas. El descubrimiento de fármacos es un proceso complejo, que involucra un esfuerzo económico considerable aun cuando no pueda garantizarse el éxito. Las plantas medicinales generalmente consisten en mezclas complejas y diversas de compuestos químicos o fitoquímicos, que pueden identificarse y caracterizarse

con enfoques diversos. A continuación, abordaremos el enfoque basado en la metabolómica para productos naturales (Yuliana *et al.*, 2013).

Los análisis de metabolómica generalmente se clasifican en dos métodos complementarios: dirigidos y no dirigidos. El enfoque dirigido tiene como objetivo identificar y cuantificar un subconjunto específico de metabolitos en una muestra; mientras que el enfoque de metabolómica no dirigida nos permite llevar a cabo una evaluación cualitativa y cuantitativa integral del contenido fitoquímico presente en la planta (Quansah y Karikari, 2016). En una búsqueda dirigida, se trata de hallar las propiedades químicas de los compuestos investigados, cuando éstas son conocidas, generalmente basándose en hipótesis que relacionan quimiotaxonómicamente la especie en estudio; mientras que el análisis no dirigido puede generar una nueva hipótesis para pruebas adicionales, midiendo todos los metabolitos de un sistema biológico.

Las plataformas de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) son utilizadas ampliamente como una valiosa herramienta para el descubrimiento y desarrollo de moléculas bioactivas, y para el control de calidad de remedios herbolarios y suplementos nutricionales, por mencionar algunas de sus aplicaciones. Además, un gran conjunto de datos generado durante el análisis LC-MS contiene información valiosa, que podría extraerse y manejarse mediante diversas herramientas estadísticas y de extracción de datos.

Para la mayoría de los metabolitos secundarios, el uso de técnicas de ionización suave como ionización por electro spray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI), permiten la detección de especies moleculares o aductos moleculares. Por lo tanto, la forma más sencilla de realizar una comparación de muestras es transformar los datos iniciales de LC-MS de cada muestra, en los valores indicados por los tiempos de retención (RT) y los valores de masa/carga (m/z) sumados a la lista de áreas de picos, creando así un nuevo espacio de características para dar paso al análisis multivariante o multivariado de datos. Para los metabolitos secundarios de microorganismos marinos, plantas, bacterias y hongos, se han sugerido varios protocolos para realizar perfiles de metabolitos no específicos (De Vos *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2010).

La cantidad de información obtenida, incluso con una sola ejecución de LC-MS, puede ser extensa, de manera que el uso de software específico para el procesamiento y la comparación de datos es crucial. En contraste con el modo de perfil, en el que la señal de masa está representada por una curva de Gauss, el modo centroide que proyecta cada señal de masa como precisa m/z valor se utiliza a menudo. La selección y alineación de picos puede realizarse mediante un software especializado, como fue anteriormente explicado en la Tabla 2.

La metabolómica se ha utilizado como una poderosa herramienta para el control de calidad y la estandarización de remedios herbolarios, mediante la utilización de varias técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Por lo tanto, es capaz de generar una “huella digital metabólica” estandarizada de remedios herbolarios específicos. Las técnicas más comunes utilizadas en metabolómica son LC-MS, GC-MS y NMR, en combinación con análisis univariantes y análisis de datos multivariados. De esta forma, las técnicas de metabolómica son ampliamente utilizadas para la identificación y caracterización de productos naturales, como los remedios herbolarios.

La mayoría de los estudios de metabolómica utilizan el método de separación cromatográfica antes del análisis espectrométrico de masas, mediante el cual se puede reducir la complejidad de la muestra y retirar efectos inherentes a la matriz de la muestra que puedan interferir durante la ionización. En LC-MS, la cromatografía líquida de fase reversa, que normalmente usa columnas C18, para separar compuestos de una amplia gama de polaridad a través de eluciones isocráticas o en gradiente, se usa ampliamente para separar compuestos semipolares, como ácidos fenólicos, flavonoides, esteroides glicosilados, alcaloides y derivados glicosilados.

Referencias

Astefanei, A., Dapic, I., Camenzuli, M. (2017). Different Stationary Phase Selectivities and Morphologies for Intact Protein Separations. *Chromatographia*, 80(5): 665-687. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3168-z>.

Atanasov, A., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E., Rollinger, J., Schus-

ter, D., Breuss, J., Bochkov, V., Mihovilovic, M., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V., Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant- derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.*, 33(8): 1582-1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>.

Bele, A. A. y Khale, A. (2011). An overview on thin layer chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2): 256-267.

Chatham, J. C. y Blackband, S. J. (2001). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging in animal research. *ILAR Journal*, 42(3): 189-208. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.3.189>.

Chawla, G. y Ranjan, C. (2016). Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3(1): 1-16. <https://doi.org/10.2174/1874842201603010001>.

Cragg, G. M. y Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6): 3670-3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.

De la Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E., García-Fajardo, J. A. (2019). Identificación de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) y nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1-13. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.179>.

De Paiva, J. R., Souza, A. S. Q., Pereira, R. C. A., Ribeiro, P. R. V., Zocolo, G. J., De Brito, E. S., Pessoa, O. D. L., Canuto, K. M. (2020). Development and validation of a UPLC-ESI-MS method for quantitation of the anti-Alzheimer drug galantamine and other Amaryllidaceae alkaloids in plants. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(2), 265-272. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190162>.

De Vos, R. C., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J., Bino, R. J., Hall, R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*, 2(4), 778-791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.95>.

Dong, M. W. (2013). The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. *LCGC North America*, 31(6): 472-479.

<https://www.chromatographyonline.com/view/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities>.

Galloway, W. R. J. D., Isidro-Llobet, A., Spring, D. R. (2010). Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules. *Nature Communications*, 1(6): 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms1081>.

Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., Kell, D. B. (2004). %Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*, 22(5): 245-252. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2004.03.007>.

Jamrógiewicz, M. (2012). Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66: 1-10. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2012.03.009>.

Kellogg, J., Paine, M., McCune, J., Oberlies, N., Cech, N. (2019). Selection and characterization of botanical natural products for research studies: a NaP-DI centerrecommended approach. *Natural Product Reports*, 36(8), 1196-1221. <https://doi.org/10.1039/c8np00065d>.

LaCourse, W. R. (2000). Chromatography: Liquid | Instrumentation. En *Encyclopedia of Separation Science* (pp. 670-676). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/00251-9>.

Lautié, E., Russo, O., Ducrot, P., Boutin, J. A. (2020). Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes. *Frontiers in Pharmacology*, 11(April): 1-37. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00397>.

Lu, X., Ji, L. J., Chen, J. L. (2014). Metabolomic Profiling of Neoplastic Lesions in Mice. En *Methods in Enzymology*, Vol. 543, Cap. 13: 261-273. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801329-8.00013-1>.

Martyr, A. J. y Plint, M. A. (2012). Engine Exhaust Emissions. En *Engine Testing*. Cuarta edición. Cap. 16: 407-450. Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096949-7.00016-9>.

Namir, H., Hadzic, R., Malesevic, I., Jurcevic, M., Starcevic, D. (2019). Application of thin layer chromatography for qualitative analysis of gunpowder in purpose of life prediction of ammunition. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 5(1): 4-12. <https://doi.org/10.15406/ijbsbe.2019.05.00144>.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2019). Reproducibility. En *Reproducibility and Replicability in Science*. Cap. 4. The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25303>.

Nováková, L., Matyssová, L., Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68(3): 908-918. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2005.06.035>.

Pauli, G. F., Chen, S. N., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Jaki, B. U. (2012). Analysis and purification of bioactive natural products: The AnaPurNa study. *Journal of Natural Products*, 75(6): 1243-1255. <https://doi.org/10.1021/np300066q>.

Piechocka, J., Wieczorek, M., Głowacki, R. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry based approach for the determination of methionine-related sulfur-containing compounds in human saliva. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23): 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms21239252>.

Quansah, E. y Karikari, T. K. (2016). Potential role of metabolomics in the improvement of research on traditional African medicine. *Phytochemistry Letters*, 17: 270-277. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.08.004>.

Santiago, M. y Strobel, S. (2013). Thin Layer Chromatography. En *Methods in Enzymology*, Vol. 533, Cap. 24: 303-324. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6>.

Schomburg, G. (1979). Practical limitations of capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 2(7): 461-474. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240020717>.

Shao, X., Bian, X., Liu, J., Zhang, M., Cai, W. (2010). Multivariate calibration methods in near infrared spectroscopic analysis. *Analytical Methods*, 2(11): 1662-1666. <https://doi.org/10.1039/C0AY00421A>.

Thomas, S. N. (2019). Mass spectrometry. En *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. Cuarta edición, Cap. 10: 171-185. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00010-7>.

Tu, Y., Jeffries, C., Ruan, H., Nelson, C., Smithson, D., Shelat, A. A., Yan, B. (2010). Automated high-throughput system to fractionate plant natural products for drug discovery. *Journal of natural products*, 73(4): 751-754. doi: 10.1021/np9007359.

United Nations Office on Drugs and Crime. (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. En *United Nations Publication*.

Urbain, A. y Simões-Pires, C. A. (2020). Thin-Layer Chromatography for the Detection and Analysis of Bioactive Natural Products. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Diciembre, 2020: 1-29. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9907.pub2>.

Vervoort, N., Goossens, K., Baeten, M., Chen, Q. (2021). Recent advances in analytical techniques for high throughput experimentation. *Analytical Science Advances*, 2(3-4): 109-127. <https://doi.org/10.1002/ANSA.202000155>.

Vinaixa, M., Schymanski, E. L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R. M., Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *Trends in Analytical Chemistry*, 78: 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>.

Yin, L., Zhou, J., Chen, D., Han, T., Zheng, B., Younis, A., Shao, Q. (2019). A review of the application of near-infrared spectroscopy to rare traditional Chinese medicine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 221: 117208. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2019.117208>.

Yuliana, N. D., Jahangir, M., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013). Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. *Phytochemistry reviews*, 12(2): 293-304. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9297-1>.

Capítulo 3.

Comités de Ética para el uso de animales de laboratorio

Claudia Verónica Rivera Cerecedo*

Ruth Jaimez Melgoza**

* Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

** Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

3.1 Uso ético de los animales de laboratorio

En la actualidad la percepción más consciente de la sociedad sobre la utilización de animales en investigación obliga a un pensamiento juicioso y a un análisis crítico. Lo anterior debido a que su uso se considera como un privilegio concedido por la sociedad a la comunidad científica, con la confianza de que su utilización proporcionará nuevos y significativos conocimientos para una mejora en el bienestar humano y animal. Es ésta una demostración de confianza, que exige el cuidado y uso de estos animales de forma responsable y humanitaria (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 1).

El debate sobre el uso de animales en investigación se divide en dos grandes grupos de opinión polarizada, hay quienes argumentan que es un atentado contra la sensibilidad de los animales y que se les produce un daño directo, y quienes afirman que el uso de animales en investigación biomédica es totalmente necesario. Sin embargo, existe también una opinión intermedia de la población, que acepta el uso de animales para experimentación, pero en condiciones concretas (Aguilar et al., 2012). Todos estos puntos de vista han contribuido al desarrollo de principios éticos en la utilización de animales, lo cual se ve reflejado en las regulaciones y marcos legales de los diferentes países.

Adicionalmente, se han establecido criterios para evaluar los protocolos de investigación que se centran en el bienestar animal, mismos que se pueden encontrar en los ordenamientos internacionales, los cuales se han ido actualizando con objeto de atender la preocupación social por el uso de animales de laboratorio.

3.2 Normativas para el uso de animales en investigación

El Reino Unido (UK) fue el primer país que promovió una ley para regular el uso de animales en investigación, cuando publicaron en 1876 la Ley de Crueldad con los animales “Cruelty to Animals Act”. Ley aprobada por el parlamento que estableció límites a la práctica con animales, determinando que quienes realizaran experimentos con “animales vivos” deberían obtener una licencia personal. La presión de la sociedad inglesa obligó a reemplazar esta ley por la Ley de procedimientos científicos con animales

(Animals, Scientific Procedures, Act 1986), misma que se encuentra vigente y que fue adaptada para cumplir con los lineamientos establecidos por la Unión Europea, siendo el Reino Unido parte de esa comunidad económica.

La Ley de procedimientos científicos solo permite el uso de animales con base en la obtención de tres tipos de licencias o permisos: licencia personal de capacitación que debe renovarse cada cinco años; licencia de proyecto que limita la participación en el proyecto de personas que cuentan con su licencia personal vigente, y dicha licencia solo es válida para un proyecto en particular; licencia o certificado del lugar de trabajo, en la cual se regulan las adquisiciones de los animales que deben ser comprados en casas comerciales certificadas. Las licencias en UK están condicionadas a la aplicación de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento), además de establecer la obligatoriedad de otorgar datos para la estadística anual de uso de animales de laboratorio (Animals, Scientific Procedures, Act 1986).

Fue en 1963, cuando en los Estados Unidos de América (USA) se publicó por primera vez “The Guide” o *Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio*, la cual establece una serie de recomendaciones que se deben utilizar como base para el desarrollo de un Programa Integral de Cuidado y Uso de Animales. Este documento es una referencia aceptada internacionalmente sobre el cuidado y uso de animales en investigación, y su cumplimiento es requerido en los Estados Unidos por el reglamento del Servicio de Salud Pública (Public Health Service Policy). Desde su primera publicación la Guía ha tenido siete actualizaciones.

Es un documento con gran aceptación en la comunidad científica internacional, que busca ayudar a las instituciones a emplear y cuidar a los animales de una manera que se considera científica, técnica y humanitariamente apropiada. La Guía también tiene como finalidad ayudar a los investigadores en el cumplimiento de su obligación de planificar y llevar a cabo experimentos con animales, de acuerdo con los más altos principios científicos, humanitarios y éticos. Las revistas indexadas exigen que los trabajos que impliquen el uso de animales hayan sido realizados con apego a lo establecido por *La Guía*. Cabe mencionar que los animales que están dentro de su marco regulatorio son únicamente vertebrados (mamíferos, aves, peces y reptiles).

En USA, la regulación a cumplir depende de la fuente de financiamiento para el proyecto de investigación, ya que las instituciones que reciben recursos del gobierno de los Estados Unidos deben apegarse a lo establecido por la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, y deben presentar una Declaración de Garantía de Derechos de los Animales (Animal Welfare Assurance Statment), la cual debe ser aprobada por la Oficina del Bienestar del Animal de Laboratorio (OLAW Office of Laboratory Animal Welfare). La Declaración debe describir de manera detallada el Programa de cuidado y uso de animales de laboratorio establecido por la institución en donde se realizará el trabajo de investigación. Más información en: (<https://www.nal.usda.gov/animal-health-and-welfare/animal-welfare-act>).

La Unión Europea se rige por la Directiva 2010/63/UE, que se enfoca en mejorar el bienestar de los animales y que entró en vigor en enero de 2013. Uno de los objetivos es lograr el reemplazo total de los procedimientos en animales vivos, poniendo énfasis en la validación de métodos alternativos al uso de animales. Esta directiva recomienda el uso de animales menos evolucionados y considera dentro de su ámbito de aplicación, además de los vertebrados, a los cefalópodos, al pez cebra e incluye a los fetos desde el tercer tercio de la gestación; la inclusión de estos animales obedece a que existen evidencias científicas de su capacidad de experimentar dolor, sufrimiento y angustia duradera.

La Directiva Europea (UE) exige un análisis estadístico riguroso para utilizar el mínimo posible de animales, y restringe el uso de animales depredados a menos que el protocolo sea aprobado por el IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee). Además, se establece que los procedimientos experimentales que produzcan dolor prolongado deben ser evaluados de manera meticulosa antes de ser aprobados (Directiva 2010/63/UE).

La legislación de la UE sobre el uso de animales es una de las más estrictas a nivel internacional; exige capacitación para las personas involucradas en los trabajos de investigación que impliquen el uso de animales, de manera que puedan obtener las licencias para el trabajo con ellos. Esta capacitación incluye cursos y módulos de aprendizaje (evaluación de lo aprendido en el curso), para demostrar la competencia en el manejo de animales, y

antes de empezar a trabajar con ellos se debe realizar un proceso de trabajo “bajo supervisión” hasta demostrar sus aptitudes.

3.3 Normatividad en América Latina y México

En América Latina existen pocos países que cuenten con leyes de aplicación nacional para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Argentina fue el primer país que contó con regulaciones en 1994, seguido por Costa Rica (1999), México (2002), Cuba (2006), Chile (2007), Brasil 2008 y por último Uruguay en 2009.

Ante la globalización comercial y las exigencias impuestas por el Tratado de Libre Comercio con USA y Canadá, la República Mexicana se vio en la necesidad de adecuarse al marco normativo internacional para el uso de animales de laboratorio. El 22 de agosto de 2001 se publicó en el *Diario Oficial de la Federación*, la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, que entró en vigor en 2002 y que es de cumplimiento obligatorio en todo el territorio nacional (NOM-062-ZOO-1999, 2001). La institución responsable de velar el cumplimiento de esta Norma es la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), mediante el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

La Norma Oficial Mexicana solo incluye roedores, lagomorfos (conejos), carnívoros, primates no humanos y porcinos (NOM-062-ZOO-1999, 2001). Uno de sus ordenamientos relevantes es que toda institución que aloje, produzca, utilice o distribuya animales de laboratorio, con fines de investigación, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, cuente con un Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), estableciendo que la responsabilidad de la creación de ese Comité recae sobre el director de la Institución. Otro de sus importantes aciertos es la instrucción para que todas las instituciones o casas comerciales que alojen o reproduzcan animales de laboratorio, deberán contar con un Médico Veterinario responsable, especialista en animales de laboratorio.

Además, las instituciones que alojen, produzcan, utilicen o distribuyan animales de laboratorio con fines de investigación, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, deberán solicitar para su

funcionamiento la visita de inspección a SENASICA para obtener el Registro como Bioterio Autorizado.

La NOM-062-ZOO-1999 contiene un apartado sobre disposiciones generales, donde se describe el perfil del personal técnico que trabaja con los animales, y las especificaciones y condiciones sanitarias para la obtención de animales en casas comerciales.

Para cada una de las especies animales incluidas en la norma, se describen las condiciones de medio ambiente (iluminación, ruido, temperatura, humedad, ventilación, climatización, etc.), los materiales y dimensiones del encierro primario, el espacio vital para cada especie animal, los métodos de identificación recomendados, salud animal, métodos de sujeción física, métodos de sujeción química, condiciones de cuarentena, así como las necesidades nutricionales y de alimentación para cada especie animal, además de las especificaciones para la movilización de los animales. La norma incluye también los aspectos de seguridad en el manejo de animales.

Existe un apartado sobre instalaciones tanto bajo techo como exteriores, que contiene especificaciones técnicas para las diferentes áreas que integran una instalación para alojar animales de experimentación (salas para animales, salas de cuarentena, cuartos de procedimientos, salas de cirugía, salas de recuperación, áreas de apoyo, almacén de consumibles, almacén de equipo, áreas de preparación de dietas, áreas de lavado, depósitos y eliminación de desechos, áreas de descanso para el personal, áreas de administración).

El apartado de técnicas experimentales incluye el manejo de analgesia y anestesia, administración de sustancias y las vías de obtención de sangre indicadas para cada especie animal. Contiene también un apartado en el que describen los criterios de elección para los diferentes métodos de eutanasia.

Se incluye un inciso para los cuidados de la salud del personal que trabaja en una instalación para animales de laboratorio, y otro sobre la capacitación requerida para este mismo personal.

La NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, contempla las visitas de verificación y las sanciones por el incumplimiento de las disposiciones contenidas en la Norma. No obstante, ésta no ha sido actualizada desde su creación, lo

que la convierte en un documento con algunos puntos obsoletos. La norma requiere de una revisión exhaustiva que incluya aspectos de importancia actuales, como el bienestar animal, el enriquecimiento ambiental, la inclusión de aspectos éticos y de los postulados de las 3Rs (reducción, refinamiento y reemplazo), además del punto final humanitario para que sea un instrumento normativo actual.

La Ciencia de los Animales de Laboratorio es un campo de rápida evolución, que ha proporcionado nuevos conocimientos científicos sobre los factores que influyen en el bienestar de los animales, y su capacidad de sentir y expresar dolor, sufrimiento, angustia y daño duradero. De acuerdo con los avances científicos más recientes (Directiva 2010/63/UE), es necesario aumentar el bienestar de los animales utilizados en procedimientos científicos, elevando los niveles mínimos de protección de los mismos e incluyéndolos en la Norma Oficial Mexicana.

3.4 El principio de las Tres Erres (3Rs)

La serie de principios y guías internacionales para la investigación biomédica que involucra animales, enunciados por el Consejo para la Organización Internacional de Ciencias Biomédicas (CIOMS, por sus siglas en inglés: Council for International Organization of Medical Sciences) y el Consejo Internacional para la Ciencia de Animales de Laboratorio (ICLAS, por sus siglas en inglés: International Council for Laboratory Animal Science), han servido de marco reglamentario desde que fueron publicados por primera vez en 1985.

En su última actualización en diciembre de 2012, se enuncian una serie de consideraciones que debería tener en cuenta la comunidad científica para el uso de animales vertebrados, tanto en actividades científicas como docentes. Entre otras recomendaciones, se encuentra que los animales deberían ser utilizados “solo si fueran necesarios y si su uso estuviera científica y éticamente justificado”. Recomienda asimismo la incorporación de los Principios de las Tres Erres en el diseño de actividades que involucren animales (Jar, 2014).

En 1959, W. M. S. Russell y R. L. Burch escribieron el libro *The Principles of Humane Experimental Technique*, documento en el que se propone una estra-

tegia práctica para un uso más prudente y equilibrado de los animales de laboratorio conocida como las 3Rs: R de reemplazo, R de reducción y R de refinamiento. Estrategia propuesta para ser aplicada por los investigadores, al realizar el diseño experimental de investigaciones que impliquen la utilización de animales de laboratorio (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Caps. 1 y 2).

Durante más de 60 años, las 3Rs se han convertido en un principio de toma de decisiones éticas ampliamente aceptado en la comunidad científica. En la actualidad, forman parte de los principios que rigen la ciencia de los animales de laboratorio, y proporcionan un marco para examinar cómo se deben tomar decisiones sobre el uso de animales en la ciencia, especialmente frente al uso cada vez mayor de éstos en la investigación básica y aplicada (Canadian Council on Animal Care, 1993). Las 3Rs son:

Reemplazo, que se refiere a aquellos métodos que evitan el uso de animales. El término incluye los reemplazos absolutos (por ejemplo, sustitución de los animales por sistemas inanimados como programas informáticos, uso de cultivos celulares, uso de modelos *in silico* para docencia, entre otros); así como también los reemplazos relativos (por ejemplo, sustitución de ciertos animales, como los vertebrados, por animales más bajos en la escala filogenética) (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 1).

Algunas alternativas para el reemplazo en el uso de animales son los reportes de estudios anteriores, el uso de software o de plantas, los modelos matemáticos, el uso de videos y modelos *in silico* para docencia, los cultivos celulares; el uso de frutas o tejidos, órganos y piel sintética para el entrenamiento quirúrgico; las nuevas herramientas diagnósticas como la resonancia magnética, las pruebas *in vitro*, así como estudios en humanos voluntarios, solo por mencionar algunas de ellas.

En el caso de los modelos informáticos, es necesario mencionar que deben estar validados. Para integrar la base de datos de estos modelos, se utiliza una enorme cantidad de datos obtenidos de animales, pero una vez recopilada la información no será necesario utilizar más animales.

En el mundo se están haciendo esfuerzos para lograr el reemplazo de los animales de laboratorio en los ensayos de rutina, por métodos alternativos

como los simuladores computarizados o sistemas biológicos *in vitro*. En algunos países, el control de eficacia de las vacunas se realiza ya mediante serología (Jar, 2014), o utilizando cultivos de tejidos en lugar de animales de laboratorio.

Reducción, ésta implica el uso de estrategias para obtener niveles comparables de información utilizando menor cantidad de animales, o bien, para maximizar la información obtenida a partir de un determinado número de animales (sin aumentar el dolor o la angustia), de manera que a largo plazo se necesiten menos animales para conseguir la misma información científica. Esta estrategia se basa en un análisis del diseño experimental, la aplicación de nuevas tecnologías, el uso de métodos estadísticos adecuados y el control de las variables relacionadas con el ambiente, en las áreas de alojamiento de animales y áreas de estudio.

Las metas relacionadas con el refinamiento y la reducción deben ponderarse para cada caso particular (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 1). La Guía desaconseja la reutilización de animales como una estrategia de reducción, mencionando que la “Reducción” no debe ser la razón para utilizar animales que haya sido sometidos a procedimientos experimentales previos, sobre todo si el bienestar de los mismos se ve comprometido.

Refinamiento, éste se refiere a modificaciones en las prácticas zootécnicas o en los procedimientos experimentales, con la finalidad de mejorar el bienestar animal y minimizar o de ser posible eliminar el dolor y la angustia de los animales (*distress*) (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 1), ya que estas condiciones producen *per se* cambios fisiológicos en los individuos que pueden alterar los resultados finales del experimento.

El refinamiento busca aumentar al máximo el bienestar de los animales, mediante la realización de procedimientos menos invasivos, con la menor duración posible o mejorando el acondicionamiento general del animal (Aguilar et al., 2012). El refinamiento se logra elaborando un protocolo experimental cuidadoso, capacitando al personal que trabajará con los animales y manteniendo a éstos en condiciones de alojamiento óptimas.

Las instituciones y los investigadores deben tomar todas las medidas razonables para eliminar el dolor y la angustia en los animales a través del refinamiento. Sin embargo, los Comités Internos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio deben entender que en algunos estudios estas condiciones no pueden ser eliminadas, pues existen líneas de investigación en las cuales los modelos animales deben utilizarse para el estudio de enfermedades que implican dolor crónico, traumatismos o afecciones del sistema nervioso central.

En la actualidad se hace necesario evaluar y analizar el daño-beneficio que se le causa al animal, por sobre el beneficio que puede ofrecer el experimento. Es de considerar si el daño causado en condiciones de sufrimiento y dolor se justifica por obtener un resultado experimental, teniendo en cuenta las consideraciones éticas y ponderando en última instancia el beneficio para el ser humano, animales o medio ambiente (Bronstad *et al.*, 2016). En la actualidad “No es posible” eliminar el uso de animales, sin comprometer la investigación biomédica.

Rusell y Burch preveían que en su propuesta de las 3Rs, el proceso de reemplazo sería un procedimiento gradual (Tannenbaum y Bennett, 2015). La modernización informática, la exploración con resonancia magnética y las pruebas *in vitro* son alternativas para el uso de animales vivos, sin embargo, aún parece lejano el momento en que se logre el reemplazo total en el uso de animales, ya que estos métodos más bien se complementan en lugar de reemplazarse.

3.4.1 Centros internacionales de las 3Rs

El interés internacional por implementar los principios de las 3Rs, ha llevado a la comunidad científica a fundar una gran cantidad de centros dedicados a crear propuestas y velar por la aplicación de estos principios en los trabajos que implican el uso de animales de laboratorio. Muchos de estos centros — como el Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación (NC3Rs)— brindan capacitación y difunden de manera muy activa material didáctico, cursos y talleres gratuitos en varios idiomas, para mantenerse actualizado en este importante tema.

Asia-Pacífico

- Consejo de Australia y Nueva Zelanda para el Cuidado de los Animales en la Investigación y la Enseñanza (ANZCCART).
- Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (JaCVAM).

Europa

- Alternativas de las 3R del Centro de Innovación Bélgica (IC-3R).
- Centro de Documentación y Evaluación de Métodos Alternativos a los Experimentos con Animales (ZEBET).
- Centro Danés 3R.
- Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM).
- Plataforma Europea de Consenso sobre Alternativas (ECOPA).
- Plataforma de Consenso Nacional de Finlandia para Alternativas (FINCOPA).
- Plataforma de Consenso Francesa sobre Alternativas (FRANCOPA).
- Fondo para el Reemplazo de Animales en Experimentos Médicos de Rin (FRAME).
- Alemania Reducir y reemplazar (R2N).
- Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación (NC3Rs).
- Plataforma de Consenso de Noruega para Alternativas (NORECOPA).
- Centro Sueco de 3Rs.
- Centro Suizo de Competencia 3Rs (3RCC).

Norteamérica

- Centro Canadiense de Alternativas a los Métodos Animales.
- Centro Universitario Johns Hopkins para Alternativas a la Experimentación con Animales (CAAT).

- Comité Coordinador Interagencias de Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM).
- Centro de Información sobre Bienestar Animal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (AWIC).
- La Colaborativa de las 3R de América del Norte (NA3RsC).

Internacionales

- Cooperación internacional sobre métodos de prueba alternativos (ICATM).
- Red internacional para la educación humana (InterNICHE).

En 1993, en Ginebra, Suiza, se produjo el primer encuentro del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos [European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)], donde se decidió que era prioritaria la implementación de las 3Rs para la producción y control de calidad de productos biológicos. A partir de ese momento, el ECVAM se dedica a promocionar estos principios a través de diversas actividades y contribuciones financieras. Los informes sobre bienestar animal elaborados por este centro son documentos de referencia en la materia, y son utilizados en los programas de entrenamiento en control de calidad de vacunas de la Organización Mundial de la Salud [World Health Organization (WHO)] (Jar, 2014).

3.4.2 Cuidado humanitario

En este capítulo se ha reiterado el término “cuidado humanitario”, el cual se refiere a aquellas medidas adoptadas para garantizar que los animales de laboratorio sean tratados de acuerdo con altos estándares éticos y científicos. La implementación de un programa de cuidado humanitario, y la creación de un ambiente de laboratorio donde se valora y alienta el cuidado humanitario, así como el respeto de los animales, forma la base de los requisitos principales de La Guía (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2) y de las instituciones que se apegan a sus lineamientos.

3.5 Programa de cuidado y uso de animales

El cuidado y uso apropiado de los animales de laboratorio en investigación, ensayos, enseñanza y producción, demanda un criterio profesional y científico basado en las necesidades de estos seres y en las intenciones de su uso. Un programa de cuidado y uso de animales comprende todas las actividades realizadas por y en una institución que tengan un impacto directo sobre el bienestar de los animales: manejo zootécnico y cuidados veterinarios, procedimientos, políticas institucionales, manejo y supervisión del personal y del programa, seguridad ocupacional, las funciones del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales (CICUAL), el diseño y manejo de bioterios o animalarios y la planificación para desastres y preparación para afrontar las emergencias (*Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*, 2017, Cap. 2).

El responsable institucional es, en primera instancia y ante las autoridades sanitarias, el responsable del Programa de Cuidado y Uso de Animales. Sin embargo, a nivel operativo, existe una responsabilidad compartida entre la Dirección General del Programa, el responsable institucional, el Médico Veterinario Responsable y el CICUAL (*Ibíd.*). Los programas de cuidado animal facilitan la actividad de los bioterios, de los usuarios (investigadores) y del CICUAL.

3.5.1 *Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)*

El CICUAL o su equivalente institucional es el responsable de la evaluación y supervisión rutinaria de los componentes del Programa de Cuidado y Uso de Animales (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2). Este Comité debe estar respaldado por las autoridades de la institución para la toma de decisiones, además de contar con suficiente autoridad y recursos para llevar a cabo su responsabilidad.

La institución es la responsable de proporcionar orientación adecuada, capacitación y entrenamiento específico a los miembros del CICUAL, para ayudarles a comprender su función y responsabilidades.

3.5.2 Integración del CICUAL

La Guía establece que el CICUAL debe estar integrado por: un Médico Veterinario Certificado o con entrenamiento y experiencia en la ciencia y medicina de los animales de laboratorio. Al menos un científico en ejercicio con experiencia en investigación científica con uso de animales. Al menos un miembro sin formación científica, proveniente de dentro o fuera de la institución. Al menos un miembro del público que represente los intereses generales de la comunidad en el correcto cuidado y uso de los animales (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2).

Para el caso particular de México, la NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, establece que el CICUAL debe estar integrado por: un Médico Veterinario titulado con experiencia comprobable en la medicina y ciencia de los animales de laboratorio; un investigador de alta jerarquía de la propia institución, con experiencia comprobable en el manejo de animales de laboratorio; y otras personas, de acuerdo con las necesidades de la institución (NOM-062-ZOO-1999, 2001). Para el buen funcionamiento del CICUAL debe haber una definición clara de las funciones de cada uno de sus miembros.

La Norma Oficial Mexicana establece en su numeral 4.2.2.3 que las funciones del Comité deben especificarse en un Manual de Organización y Procedimientos. Establece también que los miembros del CICUAL deben reunirse al menos dos veces al año, para la revisión del programa de cuidado animal y para inspeccionar las instalaciones. Realizar reuniones para la revisión de protocolos y para hacer recomendaciones al funcionario institucional, sobre cualquier aspecto de los programas de cuidado animal, instalaciones o adiestramiento del personal; y para tomar la decisión de suspender actividades que involucren animales bajo ciertas circunstancias. Tradicionalmente, estas actividades se han realizado a través de reuniones a las que asisten físicamente los miembros del CICUAL. Tales reuniones proporcionan el tipo de ambiente que es más propicio para una deliberación reflexiva e interacción, y se consideran como el foro óptimo para las reuniones del comité (Garnet y Potkay, 1995).

Con el advenimiento de los avances tecnológicos, las reuniones se realizan mediante videoconferencias, en lugar de cara a cara, lo que amplía la

posibilidad de contar con asesores externos internacionales o de otras localidades. Sin embargo, la validación de ese tipo de reuniones virtuales debe estar aprobada en el manual de procedimientos del Comité. A partir de 2019 y debido al confinamiento derivado de la pandemia de COVID-19, estos recursos tecnológicos se convirtieron en una herramienta que permitió continuar con las actividades de los Comités de Uso de Animales de Laboratorio, a pesar de las restricciones sanitarias, y fueron adoptados y validados para el funcionamiento de la vida institucional.

3.5.3 Responsabilidades del CICUAL

Como lo marca la Guía de cuidado y uso de animales, el CICUAL es el responsable de la evaluación y supervisión rutinaria de los componentes del Programa de cuidado y uso de animales. El programa incluye:

3.5.4 Capacitación y educación

Todo el personal que participa en el cuidado y uso de los animales debe ser adecuadamente educado, capacitado y calificado, en los principios básicos de la ciencia de los animales de laboratorio, para favorecer la alta calidad científica y bienestar de los animales (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2).

Los Médicos Veterinarios que supervisan o apoyan el programa deben tener experiencia y una adecuada formación, para evaluar la salud y el bienestar de las especies animales utilizadas en la institución. La ciencia y medicina de animales de laboratorio son disciplinas en evolución que cambian rápidamente y requieren de actualización permanente. La Institución debe proporcionar las oportunidades y el apoyo necesario para el constante desarrollo profesional y la educación continua del personal involucrado, con el fin de ponerlo al día en las prácticas y procedimientos vanguardistas, para que los animales reciban cuidado de alta calidad.

La NOM-O62-Z00-1999 establece que los Médicos Veterinarios Responsables de Bioterio deben estar preferentemente certificados, para ello, SENASICA ha creado la figura de Médico Veterinario Responsable Autorizado. Para alcanzar ésta, se requiere tomar un curso de capacitación organizado por la Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zoo-

tecnistas de México, A. C., antes de presentar el examen. La autorización para este órgano de coadyuvancia con la Secretaría debe renovarse cada dos años.

Para los Médicos Veterinarios que desean demostrar su experiencia en Medicina Veterinaria de Animales de Laboratorio, existe la alternativa de certificarse ante el CONSERVET A. C. (Consejo Nacional de Certificación en Medicina Veterinaria y Zootecnia, A. C) (<https://www.conservet.org.mx>). Este organismo otorga el certificado mediante la evaluación curricular, sin embargo, la certificación no sustituye a la figura del Médico Veterinario Autorizado de Bioterio, requerida por las autoridades sanitarias del país para que los Bioterios estén autorizados.

La institución debe encargarse de que el personal técnico que atiende y cuida a los animales reciba capacitación formal, preferentemente en su sitio de trabajo, para facilitar la implementación efectiva del Programa de cuidado y uso de animales, así como su uso humanitario. El personal técnico debe recibir el entrenamiento necesario y contar con la experiencia adecuada para llevar a cabo las tareas de la cuales es responsable.

En el caso particular de México, no se cuenta con una tecnicatura para que el personal que atiende a los animales en los bioterios se profesionalice, y es responsabilidad de cada institución brindar la capacitación suficiente para el desarrollo adecuado de las labores en los animalarios.

Por su naturaleza, el trabajo del técnico de bioterio es una de las principales influencias ambientales y sociales determinantes para el bienestar del animal. Sin embargo, en nuestro país las condiciones de trabajo y la existencia de una legislación desactualizada han ocasionado que su labor sea subestimada. El papel principal del técnico de animales de laboratorio es salvaguardar el bienestar de los mismos, al tiempo que apoya la misión de investigación, a través de actividades diarias de cuidado. Al realizar la observación cotidiana durante su rutina de trabajo, es el más indicado para detectar de manera rápida y fácil cualquier variación de la normalidad, cumpliendo un papel fundamental para la identificación, mantenimiento y mejora de las condiciones de bienestar de los animales bajo su cuidado.

La capacitación y educación integrales contribuyen a formar técnicos aptos para el cuidado. Existen numerosas opciones para el entrenamiento de

los técnicos y del personal responsable del cuidado de los animales. Muchas universidades han acreditado programas en tecnología veterinaria de dos años que otorgan títulos de Asociado en Ciencias, pero existen programas de cuatro años que otorgan Grados o Licenciaturas en Ciencias. Hay disponibles programas de certificación o entrenamiento sin título académico, para técnicos y tecnólogos en animales de laboratorio, a través de Asociaciones para la Ciencia de los Animales de Laboratorio, de los Estados Unidos (American Association for Laboratory Animal Science, AALAS) (*Guía para el cuidado y uso de Animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2).

3.5.5 Seguridad y salud ocupacional del personal

Como parte esencial del programa global de cuidado y uso de animales, cada institución debe establecer y mantener un programa de seguridad y salud ocupacional —acorde con las normas estatales, federales y locales—, que debe centrarse en mantener un ambiente seguro y saludable en el sitio de trabajo (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap.2).

3.5.6 Revisión de protocolos

El protocolo para el uso de los animales de laboratorio es una descripción detallada del uso propuesto de los mismos. Los miembros del comité deberán evaluar los elementos científicos del protocolo que se relacionan con el bienestar y el uso de los animales: comprobación de la hipótesis, tamaño de la muestra, número de grupos, la idoneidad de los controles que pueden estar directamente vinculados con la prevención del uso innecesario de individuos o la duplicación de experimentos. Si alguno de los miembros del CICUAL es parte del protocolo o tiene conflicto de intereses, debe abstenerse de participar en la toma de decisiones relativas a dicho protocolo (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2). La evaluación de los protocolos debe considerar en primera instancia la posibilidad del **Reemplazo**; si eso no fuera posible entonces se debe revisar la propuesta de **Reducción** en el uso de animales; y finalmente debe revisar todos los procedimientos para conocer la posibilidad de **Refinar**, de algún modo, las prácticas que se realizarán con ellos.

En ocasiones, los protocolos incluyen procedimientos de los cuales no se tiene conocimiento previo, o que tienen el potencial de causar dolor o angustia sin la posibilidad de preverlos o controlarlos de forma fiable. En cuanto a dichos procedimientos y el propósito del estudio, se deberá procurar presentar y justificar con información relevante, verificable y objetiva a partir de la literatura, de veterinarios, investigadores y otras personas conocedoras de los efectos en animales de dichos procedimientos. Si se sabe muy poco acerca de un procedimiento en particular, será apropiado conducir un “estudio piloto limitado”, diseñado para evaluar los efectos del procedimiento en los animales y la destreza del grupo de investigadores, siempre bajo la supervisión del CICUAL (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap.2).

Como parte del protocolo, el CICUAL debe promover un análisis de daño-beneficio en el uso de animales, equilibrando los beneficios derivados de la investigación o actividad educativa con el potencial dolor o angustia experimentado por el animal, para ser evaluado durante el proceso de revisión, y sopesar los posibles beneficios que se acumulan como resultado de la investigación. Este análisis debe hacerse antes de la aprobación final del protocolo y debe ser una consideración muy importante en el proceso de revisión (Bronstad et al., 2016; Laber et al., 2016).

3.5.7 Monitoreo post aprobación

La supervisión continua se debe realizar en cuanto a los protocolos y al cumplimiento de los reglamentos. El monitoreo postaprobación ayuda a garantizar el bienestar de los animales y puede brindar oportunidades para refinar los procedimientos de investigación. Las inspecciones al laboratorio se deben realizar tanto de manera programada como aleatoria. La vigilancia del veterinario o del CICUAL a procedimientos seleccionados; la observación de los animales por sus cuidadores, los veterinarios y los miembros del CICUAL; y las inspecciones y evaluaciones reglamentarias externas.

El nivel de formalidad y la intensidad de los monitoreos postaprobación se deben adaptar a la complejidad y tamaño institucional, y en todos los casos deberán apoyar una cultura enfocada en cuidar el bienestar de los animales (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2).

3.5.8 Planificación para desastres y preparación para emergencias

Los bioterios pueden verse afectados por condiciones inesperadas que produzcan la falla catastrófica de sistemas críticos, por ausentismo significativo del personal u otros eventos inesperados que comprometan seriamente el cuidado y bienestar continuo de los animales. Por ello, los bioterios deben contar con un “Plan de desastre”, el cual debe definir acciones necesarias para evitar dolor, angustia y muerte a los animales debido a la pérdida de sistemas, como los que controlan la ventilación, enfriamiento, calefacción o provisión de agua potable. Si es posible, el plan debe describir cómo salvaguardar aquellos animales que son necesarios para las actividades críticas de investigación o que son irremplazables.

La ubicación geográfica del bioterio puede orientar en cuanto a la probabilidad de un determinado tipo de desastre (inundaciones, terremotos, incendios, etc.).

Los planes de desastre se deben establecer en conjunto con los investigadores responsables, teniendo en cuenta criterios de priorización para decidir entre las poblaciones de animales y las necesidades y los recursos institucionales, con el fin de disponer que los animales que no puedan ser reubicados o protegidos de las consecuencias del desastre, deben ser sometidos a eutanasia humanitaria. El plan de desastre deberá identificar al personal esencial, el cual deberá ser capacitado con anticipación para la ejecución del plan. Se deberán hacer esfuerzos para asegurar la seguridad del personal, y permitir el acceso del mismo durante o inmediatamente después de un desastre.

Estos planes deberán ser aprobados por la institución y formar parte del plan institucional de respuesta ante desastres, que es coordinado por alguna autoridad administrativa de alto nivel (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2).

Los Planes de Desastre incluyen eventos como incendios, inundaciones y terremotos, entre otros. Sin embargo, a partir del 2020 y debido a la Pandemia por COVID-19 —que afectó gravemente a todo el mundo y se extendió por más de dos años—, en la mayoría de los bioterios se hizo necesario incluir en estos Planes, las acciones a tomar en caso de pandemia para

garantizar la atención y el bienestar de los animales. Para el plan de desastre en caso de pandemia, se deben crear estrategias para la rotación del personal esencial, así como para la capacitación, que deberá incluir la implementación de medidas sanitarias y de bioseguridad que permitan disminuir riesgos y preservar la salud de los trabajadores.

3.5.9 Confidencialidad

El reglamento del CICUAL debe establecer lineamientos de confidencialidad, y todos los miembros deben comprometerse por escrito a no divulgar y compartir la información que analiza el comité. No están autorizados para divulgar información sobre las instalaciones de investigación, incluyendo la concerniente a los protocolos. El cargo como miembro del CICUAL representa un cargo de mucha responsabilidad, ya que los datos que se manejan contienen información sensible que puede involucrar a personas o animales, y las consecuencias de difundir esos datos pueden ser graves.

Las autoridades reguladoras permiten a los Comités de cuidado animal un enfoque en las regulaciones “basado en el desempeño”, que se centrará en los resultados esperados en lugar de los procedimientos. Desafortunadamente, esta flexibilidad regulatoria ha provocado que algunas instituciones creen complejos procedimientos, con la intención de exceder el mínimo de requisitos para autorizar los protocolos. Dentro de este marco regulatorio flexible, es importante que los comités establezcan requisitos y procedimientos simples y específicos, promoviendo su amplia comprensión. La experiencia sugiere que la ambigüedad a nivel local da como resultado muchos efectos secundarios no deseados y confusión, situaciones que resultan contraproducentes, volviendo las operaciones del comité ineficientes y perjudicando el bienestar animal (DeHaven, 2002).

3.6 Punto final humanitario y punto final experimental

Algunos protocolos de uso animal incluyen procedimientos o métodos que requieren consideraciones especiales durante el proceso de revisión del CICUAL, debido a su potencial para causar dolor o angustia que no será aliviado; el comité está obligado a ponderar los objetivos del estudio *versus* los potenciales inconvenientes en el bienestar animal.

El *punto final experimental* en un estudio ocurre cuando las metas y objetivos científicos se han alcanzado. El *punto final humanitario* es el momento en el cual el dolor o angustia en un animal de experimentación es evitado, terminado o aliviado. El uso de puntos finales humanitarios contribuye al refinamiento, al generar alternativas a puntos finales experimentales que causarían dolor y angustia severos, o sin alivio, incluida la muerte.

Para muchos experimentos invasivos, los puntos finales experimentales y humanitarios están estrechamente vinculados, y deberían ser considerados cuidadosamente durante la revisión del protocolo por el CICUAL. Si bien todos los estudios deberían utilizar criterios de punto final humanitario, las investigaciones que generalmente requieren de consideraciones especiales son aquellas que implican modelos de tumores, enfermedades infecciosas, pruebas de vacunas, modelos de dolor, trauma, producción de anticuerpos monoclonales, evaluación de efectos toxicológicos, insuficiencia de órganos o sistémica y modelos de shock cardiovascular.

El investigador principal, quien tiene un conocimiento preciso de los objetivos del estudio y del modelo propuesto, debería identificar, explicar e incluir en el protocolo de uso de animales un punto final que sea válido desde el punto de vista científico y humanitario a la vez. No obstante, la identificación de un punto final humanitario es a menudo difícil, debido a que se deben sopesar múltiples factores, incluyendo el modelo animal, la especie, estado de salud del individuo, objetivos del estudio, requisitos regulatorios y la literatura científica.

En la determinación del punto final humanitario debería participar el investigador principal, el veterinario y el CICUAL, y de ser posible debería definirse antes de iniciar el estudio (*Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, 2017, Cap. 2), para lo que se puede realizar un protocolo piloto con un pequeño grupo de animales. El punto final humanitario se debe aplicar cuando los resultados científicos ya no serán útiles por más que se continúe con el experimento; cuando hay una falta de proporcionalidad entre el sufrimiento del animal y el beneficio obtenido; cuando el sufrimiento del animal ha excedido los límites humanitarios, independientemente del beneficio obtenido; y, finalmente, cuando puede emplearse un sustitutivo de punto final.

El punto final sustitutivo se da cuando un alto grado de sufrimiento puede estar justificado, pero no hay necesidad de causarlo, ya que puede predecirse el punto final científico de modo previo, a un nivel pre-lethal o de pre-dolor.

Mientras que la reducción del número de animales utilizados en la investigación está en consideración, se pone poco énfasis en la vida de un solo animal, y por eso hay menos control sobre los animales sacrificados que sobre los métodos de sacrificio.

En el pasado no era infrecuente confundir muerte con punto final. Sin embargo, la muerte está raramente relacionada con la variable experimental en estudio. No así efectos indirectos, como la deshidratación o la inanición de los animales, incapaces de beber o comer después de un procedimiento quirúrgico. La deshidratación conlleva hemoconcentración a la cual el corazón no puede hacer frente, por lo que se produce un fallo cardíaco. En roedores una ingesta inadecuada de comida puede desembocar en una baja temperatura corporal y conducir a su muerte.

Un animal puede tardar varios días en morir, y por ello debe establecerse un momento de punto final sustitutivo. Se deben establecer los signos clínicos que preceden irrevocablemente a la muerte y utilizarlos para decidir el momento de punto final pre-lethal.

Esta idea de utilizar anticipadamente los signos clínicos para predecir otros posteriores, requiere de estudios de validación, donde se demuestre que los animales seguramente progresaran en ese sentido y que el momento de punto final puede basarse en este hecho. Los organismos oficiales que otorgan subvenciones tienen la obligación moral de apoyar las investigaciones sobre el punto final humanitario. Estos métodos pueden utilizarse en los test de toxicidad, la evaluación de medicamentos tales como la efectividad de las vacunas, la protección de animales en la valoración de nuevos antibióticos, las evaluaciones de la virulencia de microorganismos o parásitos, etc. (*Guía para el punto final humanitario*, 2005).

Una herramienta útil para establecer el punto final experimental o el punto final humanitario definitivamente son las hojas de valoración.

3.6.1 Hoja de valoración

En todos los procedimientos experimentales, y especialmente en aquellos de severidad media o alta, debe incluirse un protocolo de supervisión de los animales que permita aplicar medidas paliativas del dolor, como es la utilización de analgésicos o el sacrificio por razones humanitarias.

Uno de los protocolos más utilizados y sencillos es el propuesto por Morton y Griffiths (1985). Este protocolo de supervisión permite cuantificar el dolor producido por un procedimiento, considerando cinco variables (pérdida de peso, aspecto, comportamiento espontáneo, comportamiento en respuesta a la manipulación y constantes vitales o fisiológicas); con base en ellas a cada animal se le asigna una puntuación variable.

Después de valorar al animal se proponen una serie de medidas correctivas, sugeridas en función de la puntuación obtenida por cada individuo. Si la puntuación final está entre 0 y 4, el animal se considera como normal; cuando la puntuación obtenida se encuentra entre 5 y 9, la sugerencia es supervisar cuidadosamente al animal y decidir si se le deben dar analgésicos; si los valores se encuentran entre 10 y 14 puntos, se interpreta como que el animal está padeciendo un sufrimiento intenso, a pesar del uso de analgésicos y debe considerarse la aplicación de la eutanasia. Cuando la puntuación se ubica entre 15 y 20 puntos, la recomendación es suprimir el procedimiento o aplicar eutanasia.

Para establecer un protocolo de supervisión será necesario homogeneizar criterios con el equipo de trabajo que participará en la revisión de los animales. Lo anterior con la finalidad de realizar una evaluación lo más objetiva posible. Para ello, se puede hacer uso de recursos como las fotografías o los videos. Las imágenes son instrumentos de gran utilidad para la implementación de los protocolos de supervisión. La frecuencia de evaluación de estos últimos se establece dependiendo de la severidad del daño que se produzca en los animales en cada tipo de procedimiento experimental.

3.7 Pautas ARRIVE

Uno de los grandes problemas en el ámbito científico es la falta de reproducibilidad de los experimentos realizados en animales, debido principalmente

a que los investigadores describen de manera escueta las condiciones en que son alojados, mantenidos y manejados durante los trabajos experimentales. Y a pesar de los esfuerzos por reglamentar el uso de animales, existen factores como la disposición de recursos económicos y el acceso a las nuevas tecnologías, que hacen a los animalarios diferentes en cada lugar del planeta. Además, aun cuando los Bioterios posean las condiciones ideales, la influencia de los manejadores, las condiciones ambientales de cada sala e incluso la ubicación de la caja dentro de los estantes de alojamiento, representan variaciones que pueden influir sobre la reproducibilidad de los trabajos con animales. Por esta razón se han formulado directrices que han sido adoptadas por la comunidad científica y las revistas de alto impacto.

A estas directrices se les conoce como las pautas ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments), las cuales se desarrollaron como parte de una iniciativa de NC3Rs para mejorar el diseño, análisis y publicación de investigación con animales (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010), tratando de maximizar la información publicada y minimizar los estudios innecesarios. Las directrices se publicaron en la revista *PLOS Biology*, en junio del 2010 (Kilkenny *et al.*, 2010), y están respaldadas por revistas científicas, sociedades académicas y los principales organismos de financiamiento para la investigación (Percie du Sert *et al.*, 2020).

Las pautas ARRIVE están dirigidas a los autores con y sin experiencia, a editores de revistas, revisores especializados y a organismos de financiamiento para la investigación. Han sido traducidas a varios idiomas y se les puede consultar en francés, alemán, chino, holandés, portugués, español, japonés e italiano. Pueden consultarse de manera gratuita en la página de National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals Research, NC3R (<https://www.nc3rs.org.uk>).

El propósito de estas directrices es: mejorar la publicación de la investigación que utilice animales; guiar a los autores sobre la información esencial que debería incluirse en un manuscrito, evitando ser demasiado preceptivos; ser flexibles para permitir la inclusión de una amplia gama de áreas de investigación y protocolos experimentales; promover la elaboración de manuscritos reproducibles, transparentes, precisos, completos, organizados

de forma lógica y bien escritos; así como mejorar la comunicación de los hallazgos de la investigación a la comunidad científica (The ARRIVE Guidelines, 2001; Percie du Sert et al., 2020).

Es útil consultar las directrices en todas las fases del estudio:

- Durante la planificación: las directrices proporcionan recomendaciones sobre el diseño experimental, minimización de desviaciones, tamaño de la muestra y análisis estadístico, constituyen una ayuda para que los investigadores diseñen experimentos *in vivo* rigurosos y fiables.
- Durante el desarrollo del estudio: los investigadores podrán seleccionar información importante sobre los métodos de estudio, la cual será necesaria para redactar el artículo a publicar.
- Al escribir el artículo: utilizándolas como una guía para asegurar que contiene toda la información importante.
- Al revisar el artículo: para asegurar que está incluida toda la información relevante para evaluar la investigación.

Las pautas ARRIVE son una guía para que el investigador describa de manera detallada el diseño de los experimentos con animales, justificando la base racional y las pruebas que sostienen cada apartado de las directrices; además proporcionan ejemplos claros de publicaciones que recogen correctamente la información pertinente. También existen las listas de comprobación ARRIVE 2.0 para rellenar, que permiten a los investigadores señalar diferentes secciones del artículo que contienen la información relativa a cada punto de interés. Las listas de comprobación también son de utilidad para que cada revista pueda ajustar los requisitos de evaluación de los trabajos de investigación que solicitan ser publicados.

Conclusiones

Mantener a los animales de laboratorio en condiciones adecuadas de manejo y alojamiento no solo proporciona condiciones de bienestar, sino que fortalece significativamente los resultados de la investigación.

En la evaluación de los protocolos experimentales, la óptica de la Bio-ética puede resultar de utilidad para el uso adecuado de los animales en investigación, ya que la reflexión que conlleva resulta positiva para la toma de decisiones, en lo referente a la aprobación o rechazo de los protocolos de investigación, por lo que debería ser considerada por los miembros del CICUAL durante los procesos de evaluación de dichos protocolos.

Para asegurar una buena ciencia, el animal debe tener una fisiología y un comportamiento normal. Existe una amplia variedad de fuentes para demostrar que los animales cuyo bienestar está comprometido, son a menudo fisiológica e inmunológicamente anormales y que los experimentos en los que son utilizados pueden llegar a conclusiones poco fiables por motivos científicos y éticos. Por lo tanto, el bienestar psicológico de los animales de laboratorio debe ser una preocupación importante para veterinarios, técnicos en animales y científicos. Como lo planteó Trevor Poole, en su artículo “Happy animals make a good science”, es mejor que el animal sea feliz debido a que su estado mental puede influir en los resultados experimentales (Pool, 1997).

El uso de animales en investigación se considera como un privilegio concedido por la sociedad a la comunidad científica, con la confianza de que su utilización proporcionará nuevos y significativos conocimientos para una mejora en el bienestar humano o animal. Es una demostración de confianza que exige el cuidado y uso de estos animales de forma responsable y humanitaria, lo que ha contribuido al desarrollo de principios éticos en la utilización de estos seres, principios que se ven reflejados en las regulaciones y marcos legales de los diferentes países, los cuales son cada día más estrictos y rigurosos.

En la actualidad el análisis del daño-beneficio a los animales de laboratorio, junto con la implementación de las 3Rs y la cultura del cuidado, son avances en el uso ético de los animales de laboratorio que, junto con las políticas de transparentar la información, permiten una mejor percepción social sobre su uso, cuando aún parece lejano el momento en que se pueda lograr un reemplazo total del uso de seres vivos en la investigación biomédica.

Referencias

Aguilar Catalán, A., Coyo Asencio, N., Giménez Terré, A. (2012). *Bioética en experimentación animal*. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Argentina.

Animals Scientific Procedures Act (1986). *Legislation.gov.uk*. (<https://www.legislation.gov.uk/ukpga/1986/14>).

AWA y AWR (1985). *Animal Welfare Act and Animal Welfare Regulations*. (https://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/AC_BlueBook_AWA_508_comp_version.pdf).

Brønstad, A., Newcomer, C. E., Decelle, T., Everitt, J. I., Guillén, J., Laber, K. (2016). Current concepts of Harm-Benefit Analysis of Animal Experiments-Report from the AALAS-FELASA Working Group on Harm-Benefit Analysis, Part 1. *Laboratory Animals*, Vol. 50 (1S): 1-20. (<https://doi:10.1177/0023677216642398>).

Canadian Council on Animal Care (1993). *Three Rs introduction. Guide to the care and use of experimental animals*. Vol. 1, segunda edición. Olfert, E. D., Cross, B. M., McWilliam, A. A. (eds.). CCAC, Ontario. (<https://ccac.ca/en/about/news-and-media/2023/10/10/contribute-to-the-review-of-the-ccacs-fish-guidelines/>).

Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos. (<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC132525>).

Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación (2023). (<https://ccac.ca/en/about/news-and-media/2023/10/10/contribute-to-the-review-of-the-ccacs-fish-guidelines/>).

Consejo Nacional de Certificación en Medicina Veterinaria y Zootecnia, A. C. Consultado en: (<https://www.concervet.org.mx>).

Council for International Organization of Medical Sciences and The International Council for Laboratory Animal Science (2012). (www.cioms.ch/images/stories/CIOMS/IGP2012.pdf).

DeHaven, W. R. (2002). Best practices for animal care committees and animal use oversight. *ILAR Journal*, Vol. 43, Suplemento: S59-62. (https://doi:10.1093/ilar.43.suppl_1.s59).

Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo (2010). (<https://www.boe.es/doue/2010/276/L00033-00079.pdf>).

Garnet, N. y Potkay, S. (1995). Use of electronic communications for IACUC functions. *ILAR Journal*, 37(4): 190-192. (<https://doi: 10.1093/ilar.37.4.190>).

Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2017). Octava ed. The National Research Council.

Guía para el punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos (2005). *Laboratory Animals*, 8: 5-12. Ed. SECAL.

Jar, A. M. (2014). Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2): 77-79. ([https://doi:10/1016/50325-7541\(14\)70051-3](https://doi:10/1016/50325-7541(14)70051-3)).

Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.*, 8(6): e1000412. (<https://doi: 10.1371/journal.pbio.1000412>).

Laber, K., Newcomer, C., Decelle, T., Everitt, J., Bronstad, A. (2016). Recommendations for Addressing Harm-Benefit Analysis and Implementation in Ethical Evaluation-Report from the AALAS-FELASA Working Group on Harm-Benefit Analysis, Part 2. *Laboratory Animals*, Vol. 50 (1S): 21-42. (<https://doi:10.1177/0023677216642397>).

Morton, D. V. y Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. *Vet. Rec.*, 116(16): 431-436. (<https://doi: 10.1136/vr.116.16.431>).

NC3Rs Reporting Guidelines Working Group (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J. Physiol.*, 588 (Pt. 14): 2519-21. (<https://doi: 10.1113/jphysiol.2010.192278>).

NOM-062-ZOO-1999 (Norma Oficial Mexicana) (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO_1999_220801.pdf).

Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., Pearl, E. J., Petersen, O. H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E. S., Silberberg, S. D., Steckler, T., Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.*, 14, 18(7): e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.

Poole, T. (1997). Happy animals make good science. *Lab. Anim.*, 31 (2): 116-124. doi: 10.1258/002367797780600198.

Rusell, W. y Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co. Limited, Londres. (<https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>).

Tannenbaum, J. y Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 54(2): 120-32.

The International Council for Laboratory Animal Science. (<https://iclas.org/>).

Capítulo 4.

Manejo adecuado de animales de laboratorio, vías de administración de fármacos y toma de muestras sanguíneas

Claudia Verónica Rivera Cerecedo*

Ruth Jaimez Melgoza**

* Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

** Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.1 Introducción

El uso de modelos animales experimentales es indispensable para el desarrollo de la ciencia y la tecnología. Y su utilización se da en una gama importante de disciplinas en ciencias de la salud, lo que hace necesaria la capacitación en el manejo de las especies, el conocimiento de los procedimientos éticos para la administración de fármacos, la aplicación del protocolo de las 3Rs (reducción, refinamiento, reemplazo) y las diversas técnicas para la toma de muestras sanguíneas, así como la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) (Russell y Burch, 1959).

El manejo adecuado de animales de laboratorio comienza desde la producción y continúa con los procedimientos experimentales desde su inicio hasta el punto final humanitario o punto final experimental, cumpliendo siempre con los principios universales de bioética.

La NOM-062-ZOO-1999 establece que en México se consideran animales experimentales: roedores (rata, ratón, cobayo, hámster y jerbo), lagomorfos (conejo), caninos (perros), felinos (gatos), cerdos y primates no humanos. Sin embargo, recientemente se establecieron protocolos en la Ciudad de México para que los caninos y felinos domésticos dejaran de utilizarse con fines de experimentación y docencia (NOM-062-ZOO-1999, 2001).

Actualmente varias universidades han optado por la utilización de especies animales exclusivamente para objetivos de investigación, y para fines de enseñanza se han reemplazado por programas de simulación en computadora.

En este capítulo se describe, además del manejo de roedores como animales de laboratorio, el uso adecuado de las vías de administración de fármacos y de la toma de muestras sanguíneas en rata y ratón.

4.2 Manejo adecuado de roedores como animales de laboratorio

Para que la manipulación de los roedores de laboratorio sea exitosa, es necesario conocer algunos temas y acciones pertinentes sobre ellos. En primer lugar, se debe considerar si se trata de animales externos recién llegados a

las instalaciones, los cuales pueden estar estresados y presentar reacciones indeseables o peligrosas para el operador. Tal es el caso de hembras amamantando, lo que hace necesario retirar a la madre de la caja antes de manipular a las crías. También es importante considerar si los animales han tenido experiencias traumáticas previas y si se trata de animales aislados (esto es particularmente importante en el caso de la rata, ya que es considerada como una especie obligatoriamente gregaria). En el caso de animales que se producen dentro de las instalaciones, éstos también pueden presentar estrés cuando son trasladados desde los lugares de producción hasta los laboratorios de experimentación. Por lo anterior, es necesario dejarlos en adaptación al nuevo espacio antes de iniciar la experimentación, proceso que se denomina aclimatación (Horizmy, 2019).

4.2.1 Aclimatación a la nueva vivienda

Cuando los animales llegan a una nueva instalación, es recomendable permitir un periodo de aclimatación antes de iniciar el protocolo experimental. Este periodo puede oscilar entre los 5 y 12 días, y es necesario para reducir los niveles de estrés producidos por el transporte o por el cambio en las condiciones ambientales de la nueva sala de alojamiento. Si se utiliza a los animales sin brindar este periodo de aclimatación, los resultados obtenidos en los protocolos experimentales perderán confiabilidad y podrían producir mayor variabilidad en la precisión de datos, debido a respuestas inespecíficas asociadas con el estrés.

Los animales estresados son más susceptibles a enfermedades secundarias y pueden tener niveles elevados de hormonas hasta una semana después del transporte. Esta respuesta de estrés inicial es común en todas las cepas de ratón, de manera que no es recomendable que los ratones sean considerados para un estudio antes de que transcurran al menos cinco días (o idealmente hasta doce días) después de su llegada, tiempo en el cual la mayoría de los animales habrán sido debidamente aclimatados (Horizmy, 2019).

Para la manipulación de los animales existen algunas situaciones que se deben evitar, como la generación de ruidos sorprendentes, fuertes o estruendos, olores extraños tales como perfumes y desodorantes, e incluso el olor del humo del cigarro impregnado en la ropa o cabello del personal que

trabaje con los animales. Estos olores pueden interferir con los protocolos experimentales, al distraer al animal o neutralizando el olor de las feromonas que son indispensables para los procesos reproductivos y conductuales de los roedores. Es recomendable evitar tardar demasiado tiempo en la sujeción del animal, ya que estará alerta y en la oportunidad de ponerse a la defensiva. También es conveniente evitar los movimientos bruscos durante el manejo, para reducir el estrés.

Cuando un roedor será incluido en un protocolo experimental es muy importante el manejo previo para su adaptación, el cual es recomendable se realice por el investigador o personal designado para realizar los protocolos experimentales, con la finalidad de que se acostumbren a su presencia (a su voz, a su olor y a su manejo); el manejo debe darse por al menos cinco o diez minutos al día. Esto se tornará en un estímulo positivo que resultará de gran utilidad para reducir el estrés de los animales.

Como parte de los protocolos de bioseguridad, la manipulación de los roedores siempre debe realizarse utilizando guantes desechables preferentemente esterilizados.

4.2.2 Manipulación del nido y actitud de la madre

Cuando se requiera manipular a una hembra que está amamantando su camada (Figura 1a), en primer lugar, se debe retirar a la madre de la caja y colocarla en una caja limpia antes de manipular a los críos. Realizando este procedimiento reduciremos el estrés de la madre y podremos manipular libremente a los críos evitando el riesgo de agresión.

Cuando se manipula a los críos es muy importante respetar en todo momento la estructura del nido para que los neonatos conserven su temperatura y se mantengan dentro de él (Figura 1b).

Debido a que los roedores son especies altriciales (animales que nacen ciegos, sin los conductos auditivos abiertos, prácticamente sin pelo y con una movilidad limitada), durante los primeros once días de edad es necesario cuidar en todo momento que mantengan su temperatura, ya que su capacidad de termorregulación es muy limitada y pueden llegar fácilmente a la hipotermia, lo que provocará que la madre detecte que el crío ha perdido vitalidad y lo saque del nido. Para manipulaciones prolongadas se re-

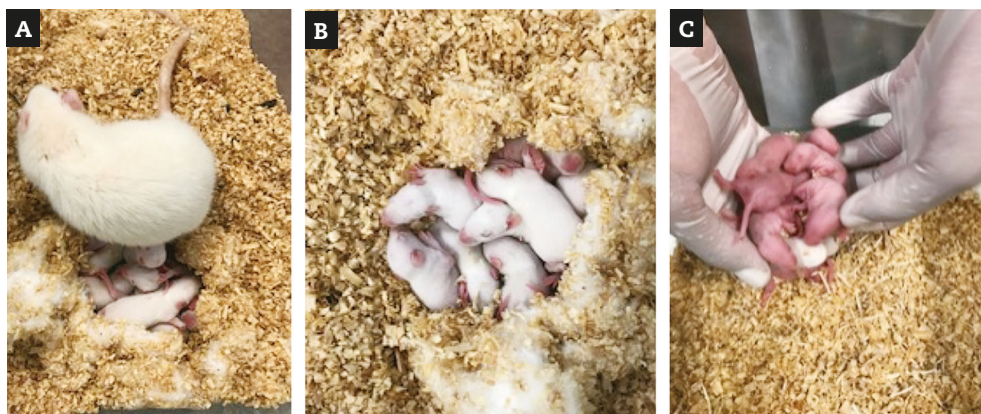


Figura 1. Cuando se requiera manipular a una hembra que está amamantando su camada (Figura 1a), se debe retirar a la madre de la caja y colocarla en una caja limpia antes de manipular a los críos. Cuando se manipula a los críos, es muy importante respetar en todo momento la estructura del nido, para que los neonatos conserven su temperatura y se mantengan dentro de él (Figura 1b). Para manipulaciones prolongadas se recomienda mantenerlos sobre un colchón térmico. Los neonatos se pueden manipular en grupo (Figura 1c) o de manera individual. **A.** Madre con su camada. **B.** Nido con críos de rata. **C.** Manipulación de neonatos recién nacidos.

comienda mantenerlos sobre un colchón térmico. Los neonatos se pueden manipular en grupo (Figura 1c) o de manera individual.

Los críos mayores de once días se pueden manipular en grupo con ambas manos (Figura 2a), o de forma independiente sujetándolos como animales adultos (Figura 2b).

4.2.3 Técnicas de inmovilización para realizar procedimientos experimentales en ratas

Antes de iniciar la descripción de los procedimientos de inmovilización, es necesario mencionar que para el manejo de los roedores se debe utilizar la mano menos hábil, para que con la mano hábil se realicen procedimientos como inyección, marcaje, anotaciones, registros, etc.

Las ratas son consideradas como roedores de talla mediana, por lo que su manejo resulta sencillo y fácil siempre y cuando se tenga el entrenamiento adecuado para ello. El secreto para un manejo exitoso es tomarlas con suavidad, pero con firmeza y confianza.



Figura 2. Los críos mayores de once días se pueden manipular en grupo con ambas manos (Figura 2a), o de forma independiente sujetándolos como animales adultos (Figura 2b). **A.** Manipulación de críos de rata antes del destete. **B.** Manipulación de críos al destete.

La inmovilización de las ratas puede realizarse sujetando la piel del dorso desde el cuello hasta la grupa (cadera), esta es una técnica que bien realizada permite que la rata se mantenga segura y menos estresada (Figuras 3a y 3b). Es ideal para una administración intraperitoneal o para la colocación de una sonda esofágica. Cuando se manipulan animales de más de 300 g o hembras gestantes, es necesario dar soporte a su cadera con la otra mano para que la columna del animal no sufra tensión (Figura 4b).

En la imagen de la izquierda podemos ver que el animal se encuentra totalmente relajado, observando la posición de sus miembros superiores e inferiores (es la posición que adoptan los críos de mamífero cuando los transporta la madre tomándolos por la piel del cuello).

Otra técnica para inmovilizar a las ratas adultas consiste en colocar el dedo pulgar por debajo del miembro anterior del animal (a la altura de la axila), y con los dedos índice y medio se inmoviliza el otro miembro (Figura 4a). Esta técnica de manejo permite una sujeción muy firme y segura.

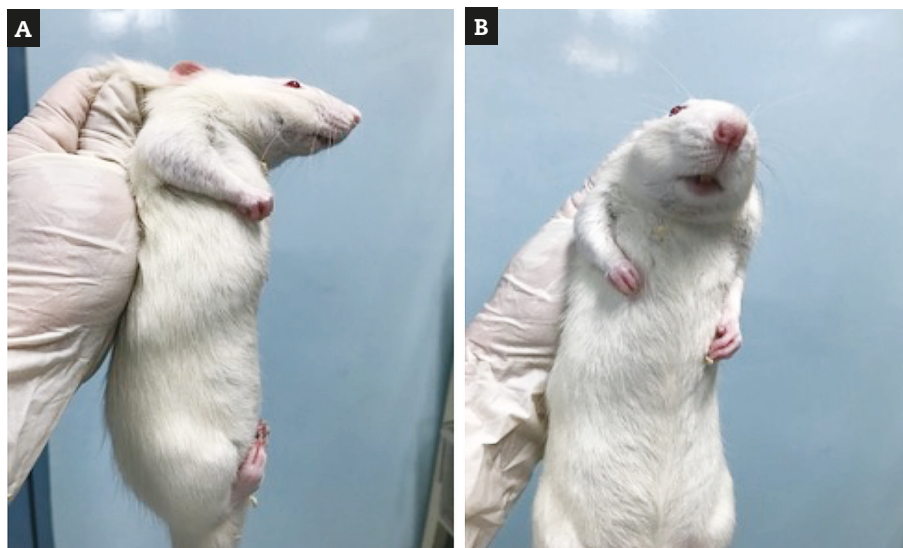


Figura 3. La inmovilización de las ratas puede realizarse sujetando la piel del dorso desde el cuello hasta la grupa (cadera), esta es una técnica que bien realizada permite que la rata se mantenga segura y menos estresada. Es ideal para una administración intraperitoneal o para la colocación de una sonda esofágica. **A y B.** Manipulación de rata adulta con la técnica de pellizco de la piel del dorso.

4.2.4 Técnicas de inmovilización para realizar procedimientos experimentales en ratones

Los ratones son roedores de tamaño pequeño cuya manipulación resulta sencilla. Aprovechando el instinto que tienen de huir, se recomienda utilizar una superficie de la cual puedan asirse, entonces se sujetan de la cola para que no escapen (puede utilizarse un paño o la rejilla del comedero, siempre y cuando tenga bordes redondeados para evitar que el animal se lastime) (Figura 5a). Con el dedo meñique colocado en la base de la cola se inmoviliza el rabo (Figura 5b), y enseguida se aplica la técnica de pellizco sobre la piel del dorso (Figura 5c) sujetando al ratón bien alineado (Figura 5d).

4.3 Vías de administración de fármacos

Existen diferentes vías de administración para los fármacos, tales como tópica, enteral y parenteral. La enteral incluye la vía oral (voluntaria, en alimentos



Figura 4. Otra técnica para inmovilizar a las ratas adultas consiste en colocar el dedo pulgar por debajo del miembro anterior del animal (a la altura de la axila), y con los dedos índice y medio se inmoviliza el otro miembro. Esta técnica de manejo permite una sujeción muy firme y segura. Cuando se manipulan animales de más de 300 g o hembras gestantes, es necesario dar soporte a su cadera con la otra mano para que la columna del animal no sufra tensión (Figura 4b). A. Sujeción de rata adulta. B. Sujeción de ratas con un peso mayor de 300 g.

o mediante sonda esofágica); y la parenteral se integra por la intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, muscular e intravenosa, entre otras.

La elección de la vía de administración se realizará conforme a la especie o cepa, su peso corporal, la distribución de grasa y las condiciones de salud propias del animal; así como a la naturaleza fisicoquímica o biológica del fármaco que, en caso de ser un sólido, deberá estar disuelto en un excipiente de pH neutro, inerte y que no produzca irritación de mucosas (por ejemplo: agua, solución salina isotónica, etanol 1 %, propilenglicol, aceite vegetal).

La sujeción adecuada es fundamental para una buena administración, independientemente de la vía, pues debe evitar la posibilidad de asfixia por exceso de fuerza o una mala administración por permitir movimientos bruscos por sujeción deficiente, lo que además puede causar daño y estrés al animal (Bogdanske et al., 2010, 2011).

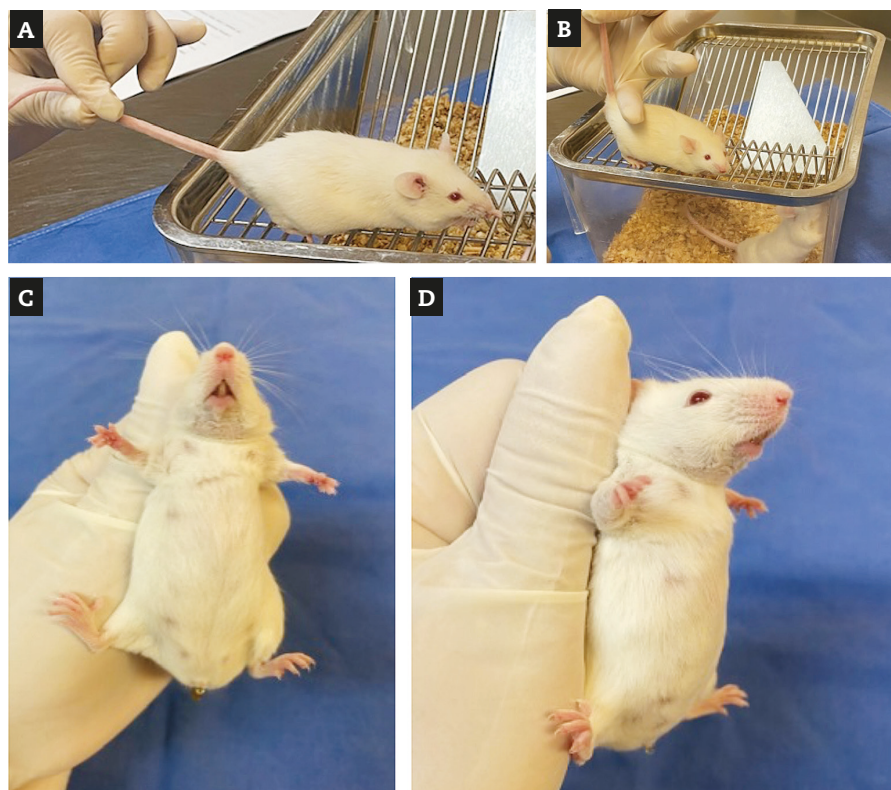


Figura 5. Los ratones se sujetan de la cola para que no escapen (puede utilizarse un paño o la rejilla del comedero, siempre y cuando tenga bordes redondeados para evitar que el animal se lastime) (Figura 5a). Con el dedo meñique colocado en la base de la cola se inmoviliza el rabo (Figura 5b), y enseguida se aplica la técnica de pellizco sobre la piel del dorso (Figura 5c) sujetando al ratón bien alineado (Figura 5d). A. Sujeción para evitar escape; B. Inmovilización de la cola; C. Sujeción de la piel del dorso. D. Correcta alineación del ratón.

4.3.1 Procedimientos de vías de administración

Vía enteral

La vía de administración oral voluntaria puede realizarse mediante la ingesta individual por goteo, con un bebedero, fármacos disueltos en cremas palatables (sabor dulce, ricas en grasa, como la crema de cacao y cacahuete), en forma de pellets o croquetas, donde el medicamento estará disuelto en

una concentración determinada. La cantidad del fármaco se dosifica en función de la cantidad de agua o alimento ingerido y del peso del animal. Para esta vía es importante considerar que la o las sustancias pasarán por el primer paso entero hepático y sus propiedades farmacológicas pueden variar.

Otra forma de realizar la administración por vía oral es utilizando cánulas flexibles que llegan directamente de la boca al estómago, donde se deposita el fármaco disuelto en agua, solución salina, soluciones de sacarosa, polímeros, geles, etc.

Para realizar adecuadamente esta técnica se requiere de conocimiento anatómico y entrenamiento para sujetar al animal, de manera que se evite la broncoaspiración por una inadecuada introducción de la sonda esofágica hacia el tracto digestivo. Se debe considerar que hay diferentes longitudes, calibres y materiales de las sondas esofágicas, que deberán seleccionarse de acuerdo con la especie animal, talla y peso.

Vía subcutánea

Esta vía consiste en depositar el fármaco en disolución debajo de la piel del animal (en el tejido subcutáneo) sin llegar al músculo, con un ángulo entre 20° y 45°. Generalmente se utiliza la parte dorsal del cuello, ya que la piel en esa región anatómica suele ser muy laxa (Figura 6a). Dependiendo del número de administraciones puede ir cambiando el sitio de administración, comenzando a nivel de la región dorsal del cuello, pasando la segunda administración a la zona lumbar media y terminando en la zona lumbar baja.

Se debe considerar el volumen máximo a administrar, ya que si es mayor a 0.5 ml en rata o 0.1 ml en ratón, la absorción del fármaco disminuye considerablemente y puede interferir en su eficacia. Cuando esta vía se utiliza para la administración de antígenos, los excipientes más utilizados son diferentes tipos de aceites para rata y ratón, con propilenglicol preferentemente en rata, ya que puede producir ceguera en ratones. El calibre de las agujas hipodérmicas más utilizadas para la administración subcutánea en la rata es el de 23G, y para ratón la de 25G. La disolución completa del fármaco a administrar es básica, ya que las suspensiones pueden tapar la luz de la aguja e impedir su correcta disposición.

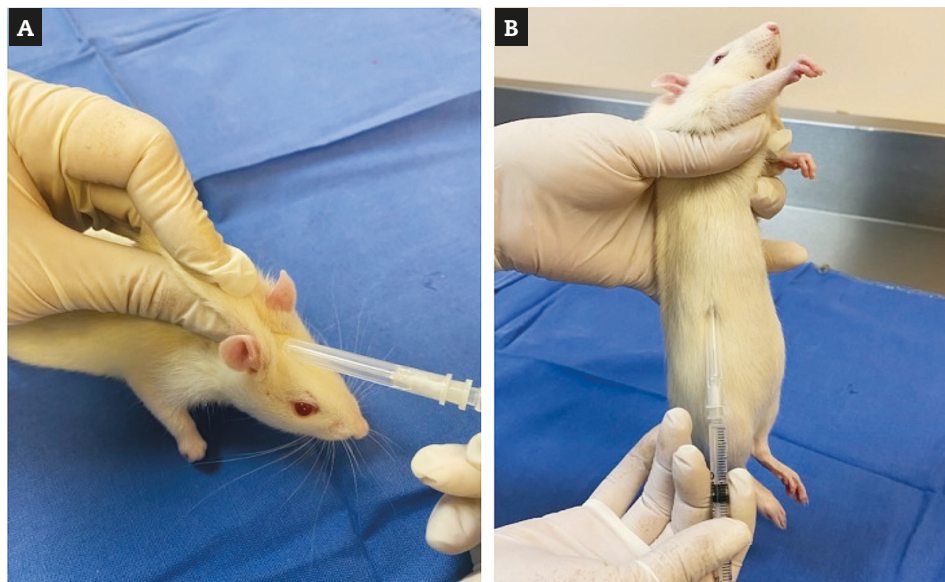


Figura 6. Vía subcutánea. Esta vía consiste en depositar el fármaco en disolución debajo de la piel del animal (en el tejido subcutáneo) sin llegar al músculo, con un ángulo entre 20 y 45°. Generalmente se utiliza la parte dorsal del cuello, ya que la piel en esa región anatómica suele ser muy laxa (Figura 6a). Para hidratar a los roedores deben administrarse las soluciones a temperatura corporal, y se prefiere dividir el volumen a administrar en dos dosis, las que se aplicarán en el tejido subcutáneo a la altura de los flancos (Figura 6b). A. Administración subcutánea para pequeños volúmenes. B. Administración subcutánea en el flanco para mayor volumen de fluidos.

Esta es una vía de elección para la administración de soluciones hidratantes en roedores, ya que resulta práctica y de fácil aplicación. Para hidratar a los roedores deben administrarse las soluciones a temperatura corporal, y se prefiere dividir el volumen a administrar en dos dosis, las que se aplicarán en el tejido subcutáneo a la altura de los flancos (Figura 6b).

Vía intraperitoneal

En roedores, esta vía es muy utilizada para administrar anestésicos y otras sustancias y generalmente el excipiente es de naturaleza acuosa para mejorar la absorción. Se administran volúmenes inferiores a 0.5 ml con agujas de 23G para rata y de 25G para ratón. Siempre con una adecuada sujeción del animal. La administración debe realizarse con el animal sujeto por el dorso,

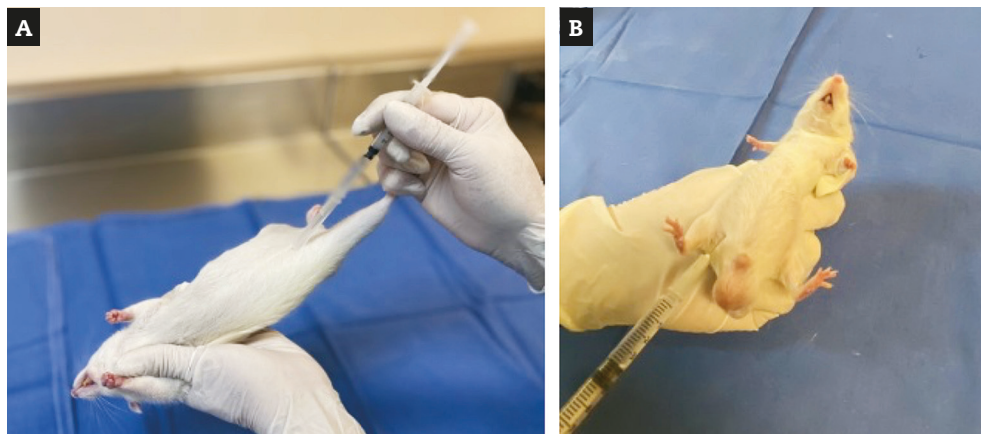


Figura 7. Vía intraperitoneal. La administración debe realizarse con el animal sujeto por el dorso, en un plano inclinado que permita que las vísceras de la cavidad abdominal se desplacen hacia la parte craneal del abdomen (Figura 7a). Para una adecuada administración se eligen los cuadrantes abdominales inferiores, para no lesionar órganos parenquimatosos como el hígado o el bazo. En los cuadrantes inferiores se debe tener cuidado de no puncionar el ciego y la vejiga. El ángulo de inyección correcto es de 45 grados (Figura 7b). A. Administración intraperitoneal en rata. B. Administración intraperitoneal en ratón.

en un plano inclinado que permita que las vísceras de la cavidad abdominal se desplacen hacia la parte craneal del abdomen (Figura 7a). Para una adecuada administración se eligen los cuadrantes abdominales inferiores, para no lesionar órganos parenquimatosos como el hígado o el bazo. En los cuadrantes inferiores se debe tener cuidado de no puncionar el ciego y la vejiga. El ángulo de inyección correcto es de 45 grados (Figura 7b).

Vía intramuscular

La elección de esta vía de administración se debe restringir en especies pequeñas de roedores, debido a su anatomía ya que sus masas musculares son pequeñas. Sin embargo, resulta una buena alternativa para la administración de algunos anestésicos y tranquilizantes, ya que es considerada como una vía de absorción media.

Esta vía se utiliza generalmente para la administración de sustancias oleosas en cantidades que no deben rebasar 0.1 ml. La administración se

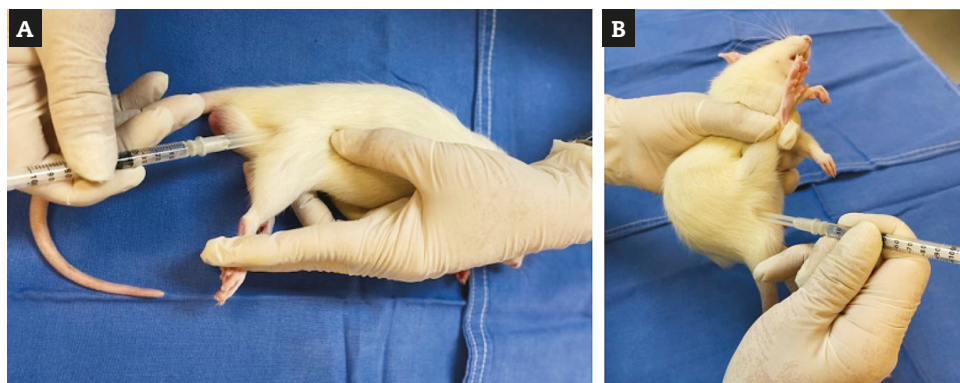


Figura 8. Vía intramuscular. La administración se realiza en el músculo bíceps femoral que se ubica a la altura del muslo (Figura 8a). La técnica de administración requiere entrenamiento y debe realizarse bajo una correcta sujeción y utilizando un calibre adecuado de agujas. El ángulo de inyección correcto es de 45 grados sobre el bíceps femoral (Figura 8b), y al momento de la administración se debe tener cuidado de no lesionar el nervio ciático ni el fémur. **A.** Sitio para la administración intramuscular. **B.** Forma de sujeción de la rata para la administración intramuscular.

realiza en el músculo bíceps femoral que se ubica a la altura del muslo (Figura 8a). La técnica de administración requiere entrenamiento y debe realizarse bajo una correcta sujeción y utilizando un calibre adecuado de agujas. El ángulo de inyección correcto es de 45 grados sobre el bíceps femoral (Figura 8b), y al momento de la administración se debe tener cuidado de no lesionar el nervio ciático ni el fémur. Una mala administración puede derivar en cojera del animal por lesiones que llegan a ser irreversibles.

Deberá de restringirse el número de administraciones, ya que pueden provocar necrosis con dolor e inflamación.

Vía intravenosa

Esta vía de administración puede realizarse como punción única o utilizarse un modelo de canulación. Las venas más frecuentemente utilizadas son las venas caudales en la rata y el ratón. Éstas se localizan en la parte lateral de la cola y son muy fáciles de identificar. Para realizar el procedimiento de administración endovenosa, es necesario contar con entrenamiento para asegurar que el fármaco o la solución se administren directamente dentro del vaso sanguíneo y no en el área periférica (Figura 9a).

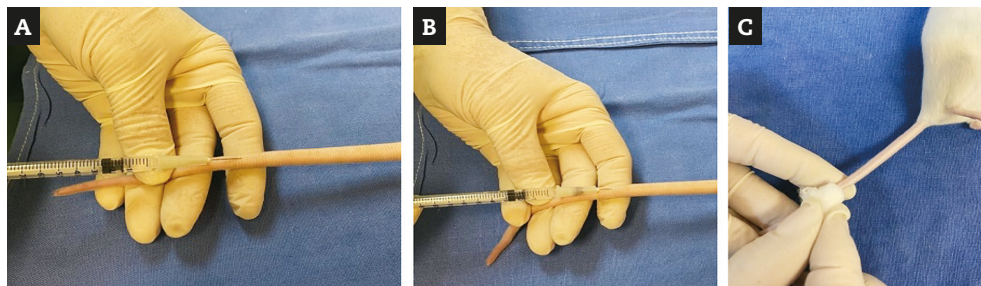


Figura 9. Vía intravenosa. Es necesario contar con entrenamiento para asegurar que el fármaco o la solución se administren directamente dentro del vaso sanguíneo y no en el área periférica (Figura 9a). El bisel de la aguja debe orientarse hacia arriba, la aguja se introduce de manera paralela a la vena (Figura 9a); para confirmar que se encuentra dentro del vaso sanguíneo, se jala el émbolo de la jeringa y se debe observar la salida de sangre (Figura 9b); después de la administración se realiza una ligera presión con una torunda de algodón seca para detener el sangrado (Figura 9c). A. Punción de la vena. B. Confirmación con extracción de sangre. C. Presión digital.

Para esta vía se debe realizar asepsia en el área en donde se realizará la punción, preferentemente con un antiséptico diferente al alcohol, ya que éste produce una vasoconstricción por el frío que genera en el área de aplicación al momento del secado. Se pueden administrar soluciones con pH extremo, aunque se prefiere que las sustancias aplicadas sean soluciones no irritantes. Se puede sujetar al animal de manera manual, aunque lo recomendable es inmovilizarlo en un cepo de contención. Este procedimiento se puede realizar con el animal despierto o anestesiado. El calibre de las agujas que se utilizan deberá permitir la canulación y la entrada de la solución. Para el caso de ratas adultas, puede utilizarse aguja azul de 23G y para ratón de 25G.

Se recomienda elegir las venas caudales o coccígeas laterales que son más superficiales que la vena dorsal.

El bisel de la aguja debe orientarse hacia arriba, la aguja se introduce de manera paralela a la vena (Figura 9a); para confirmar que se encuentra dentro del vaso sanguíneo, se jala el émbolo de la jeringa y se debe observar la salida de sangre (Figura 9b); después de la administración se realiza una ligera presión con una torunda de algodón seca para detener el sangrado (Figura 9c) (Turner *et al.*, 2011).

4.3.2 Errores comunes en la administración de fármacos

En la vía oral se puede provocar broncoaspiración por la incorrecta canulación. En la vía subcutánea se pueden producir pinchaduras de los músculos dorsales, debido al ángulo incorrecto de la inyección (mayor a 45°), por el movimiento del animal y la longitud de la aguja; necrosis muscular por la incorrecta inyección intramuscular; hemorragias y daño de venas o arterias, debido a la mala canulación y a un calibre inadecuado de la aguja. También por el uso de soluciones irritantes, pH muy ácidos o básicos o por falta de experiencia para sujetar al animal.

4.4 Toma de muestras

Existen diferentes lugares anatómicos para realizar tomas de muestras sanguíneas y otros tipos de muestras (isopados vaginales, biopsias, saliva, orina, heces, sangre, etc.). En algunos casos, éstas pueden requerirse estériles y pueden ser de toma única o de varias. Algunas requieren anestesia y otras se realizan a través de cateterización, para la obtención de plasma o suero; etc. Este capítulo incluye solo los procedimientos para la toma de muestras sanguíneas.

4.4.1 Toma de muestra sanguínea

Para el caso de la muestra sanguínea es necesario considerar la frecuencia en la toma de muestra, el volumen y el tipo de sangre que se requiere para el protocolo experimental (arterial o venosa, estéril o no estéril, citrada, heparinizada, etc.) con la finalidad de elegir la vía más conveniente.

En algunos casos puede requerirse una sola muestra sanguínea en el punto final del experimento o una serie de tomas a través de éste o ambos.

Para la toma de muestra sanguínea se deben considerar algunos factores importantes, tales como la especie animal; es necesario conocer el peso del individuo para calcular el volumen adecuado que se va a obtener y evitar choque hipovolémico, anemia y deshidratación; el tipo de muestra, la calidad de la misma, la frecuencia de las tomas, el estado fisiológico del animal (si está sano o tiene alguna patología inducida para los fines del protocolo), experiencia para realizar la flebotomía, calibre de las agujas, etc.

Los sitios donde se toman muestras sanguíneas son: seno venoso retroorbital, vena submaxilar, vena safena, vena caudal, vena podal y vena yugular. La toma de muestra sanguínea directamente del corazón debe realizarse con el animal bajo anestesia general y debe ser un procedimiento terminal (sin sobrevida del animal). También se puede realizar exanguinación por decapitación o toma total del volumen sanguíneo con aguja o catéter (Christensen, 2009).

Volumen adecuado de la muestra

Es aceptable tomar una muestra sanguínea desde un 7.5 % hasta un máximo del 15 % del volumen total de sangre circulante, lo que se conoce como “volemia”, cada 3 a 4 semanas y la cantidad de sangre extraída se repondrá con una solución salina fisiológica por vía endovenosa, subcutánea o intraperitoneal. Para tomas frecuentes es admisible hasta un 1 % del volumen cada 24 h.

Deberá considerarse que el volumen total de sangre circulante en un animal sano e hidratado corresponde a 72 ml/kg. Por ejemplo, una rata que pesa 250 g ($72 \text{ ml} \times 0.25 \text{ kg}$) tendrá un volumen aproximado de 18 ml, que equivale a 1.8 ml de sangrado seguro de una sola toma o 0.18 ml para tomas frecuentes de cada 24 h.

Los signos de choque hipovolémico comprenden: hiperventilación, hipotermia, mucosas secas y pálidas, taquicardia y arritmia cardíaca. También se puede presentar una condición de anemia.

4.4.2 Toma de muestra del seno venoso retro-orbital

En este procedimiento es indispensable anestesiarse al animal, comprobando que se encuentre en plano profundo (falta de reflejos podal, palpebral, relajación muscular y respiración toraco-abdominal profunda). Éste deberá colocarse en posición decúbito lateral hacia el experimentador. Con el índice y el pulgar se debe retraer la piel de la cara para exponer el globo ocular. Entonces un tubo capilar de microhematocrito se inserta en la mucosa palpebral, preferentemente en el canto lateral del ojo para no dañar la glándula de Harder (Figura 10a).

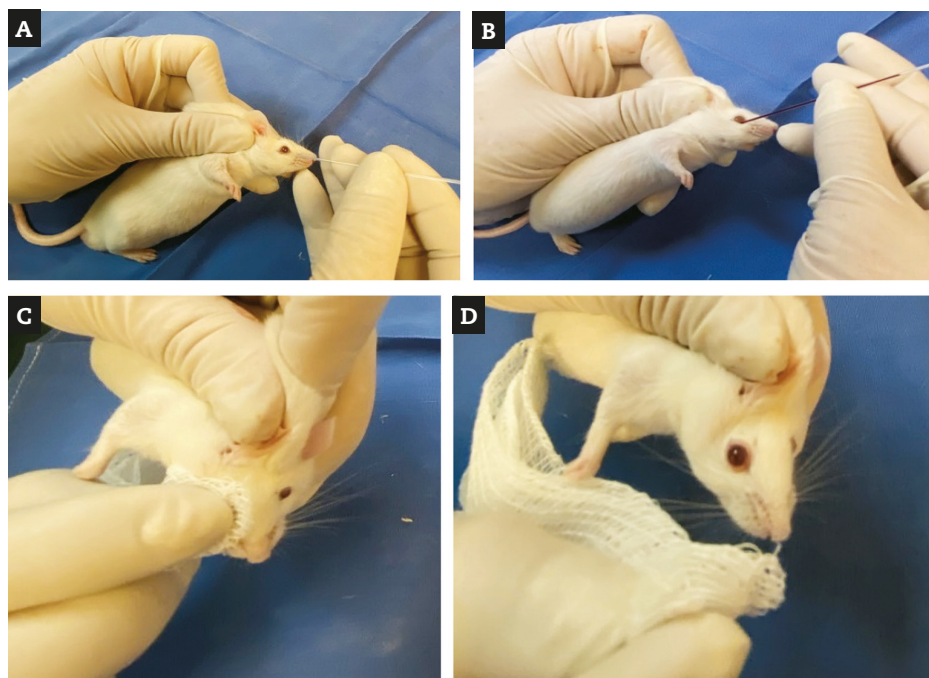


Figura 10. Toma de muestra del seno venoso retroorbital. Colocar en posición decúbito lateral hacia el experimentador. Con el índice y el pulgar se debe retraer la piel de la cara para exponer el globo ocular. Se inserta un tubo capilar de microhematocrito en la mucosa palpebral (Figura 10a). Con un ligero giro del tubo capilar en el sentido de las manecillas del reloj se rompe el seno venoso retro-orbitario (Figura 10b). Al terminar el procedimiento se realiza un poco de presión digital (Figura 10c) y el globo ocular se mantiene intacto (Figura 10d). A. Colocación del tubo capilar en canto lateral del ojo. B. Extracción de sangre. C. Compresión digital para realizar hemostasis. D. Recuperación del animal después del procedimiento.

El tubo capilar puede estar heparinizado o no, dependiendo de las determinaciones que se realizarán con la muestra. Con un ligero giro del tubo capilar en el sentido de las manecillas del reloj se rompe el seno venoso retro-orbitario, la sangre se obtiene de manera rápida llenando el tubo capilar, lo que sería suficiente para realizar una biometría hemática (Figura 10b). Si se requiere de un volumen mayor de sangre, se puede coleccionar por goteo en un tubo eppendorf. Al terminar el procedimiento se realiza un poco de presión digital con una torunda de algodón seco para realizar la hemostasia

(Figura 10c) y el globo ocular se mantiene intacto (Figura 10d) (Van Herck et al., 2001).

4.4.3 Toma de muestra de la vena submaxilar o seno venoso submandibular

Esta técnica se utiliza principalmente en ratón, no requiere anestesia, solo una inmovilización correcta, estirando la piel del cuello para promover la estasis. Se puede punzar con una lanceta o la punta de una aguja de 18G a 21G (Figuras 11a y 11b) y recolectar las gotas de sangre con un capilar o un

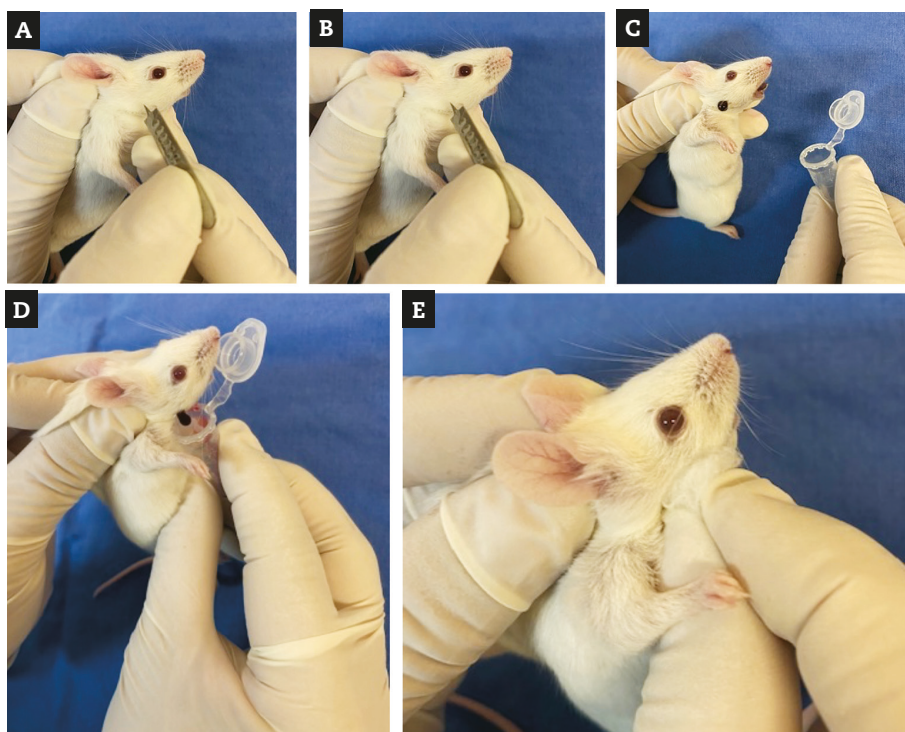


Figura 11. Toma de muestra del seno venoso submandibular. Se puede punzar con una lanceta o la punta de una aguja de 18G a 21G (Figuras 11a y 11b) y recolectar las gotas de sangre con un capilar o un microtubo (Figuras 11c y 11d). Al término de la toma, el área se limpia y se ejerce presión digital con una torunda de algodón seca para realizar la hemostasia (Figura 11e), posteriormente se regresa el animal a su jaula. A. Ubicación del sitio de punción. B. Punción con lanceta. C. Obtención de gota de sangre. D. Obtención de sangre por goteo en tubo. E. Presión digital.

microtubo (Figuras 11c y 11d). Al término de la toma, el área se limpia y se ejerce presión digital con una torunda de algodón seca para realizar la hemostasia (Figura 11e), posteriormente se regresa el animal a su jaula (Golde et al., 2005).

4.4.4 Toma de muestra de la vena safena

Este procedimiento no requiere que el animal se encuentre anestesiado, pero es necesaria una sujeción que permita extender el muslo del animal (Figura 12a). Se rasura el sitio de punción para observar la vena y se realiza asepsia

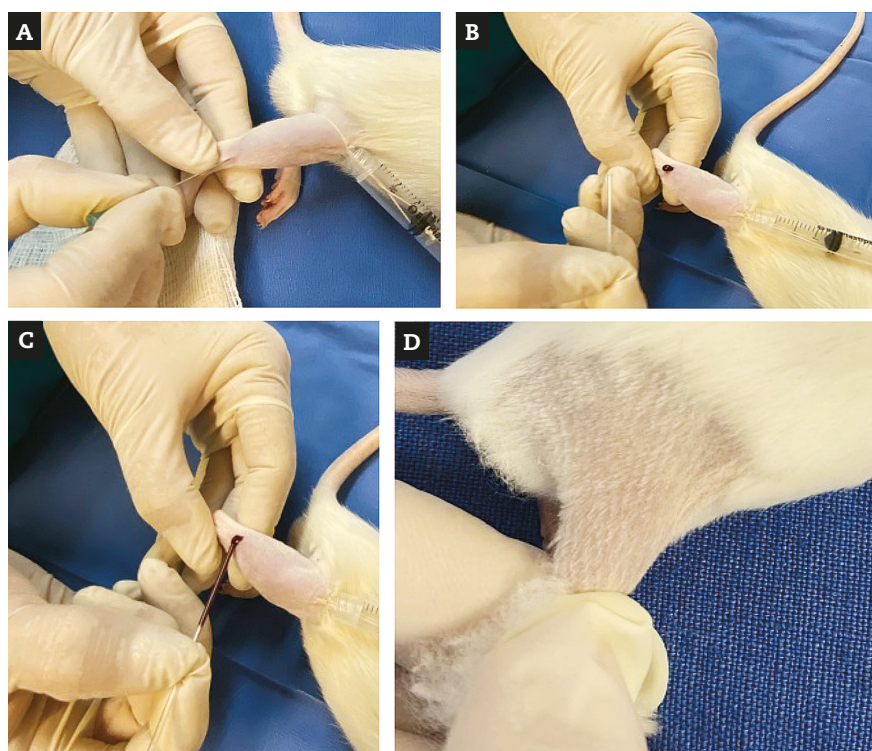


Figura 12. Toma de muestra de la vena safena. El animal deberá estar inmovilizado para permitir extender el muslo y colocar un torniquete (Figura 12a). Rasurar el sitio de punción y realizar asepsia. La vena se punza con una aguja de 25G (Figuras 12b) y la sangre se recolecta con un tubo capilar (Figura 12c). Al término del procedimiento se debe realizar una ligera presión digital con una torunda de algodón seca para detener el sangrado (Figura 12d). A. Colocación de torniquete y punción de vena safena. B. Obtención de sangre. C. Toma de muestra sanguínea con tubo capilar. D. Hemostasia con presión digital.

del área con un antiséptico. La vena se punza con una aguja de 25G (Figura 12b) y la sangre se recolecta con un tubo capilar (Figura 12c). En este procedimiento se pueden realizar varias tomas al retirar el sitio de cicatrización.

Es necesario recordar que la vena safena es una vena muy móvil, por lo que es conveniente tensar la piel del miembro para inmovilizarla al momento de la punción.

Para un mayor éxito recomendamos colocar un pequeño torniquete o ligadura a la altura de la rodilla, lo que permitirá resaltar la vena por la estasis sanguínea (Figura 12a). Al término del procedimiento se debe realizar una ligera presión digital con una torunda de algodón seca para detener el sangrado (Figura 12d) (Hem et al., 1998).

4.4.5 Toma de muestra de la vena caudal

En esta toma de muestra no es requerida la anestesia, solo colocar el animal en un cepo de contención para evitar el movimiento. En el caso de ratones se pueden utilizar agujas de 25 a 27G y se obtiene un volumen entre 100 a 150 μ l; mientras que en ratas, se utilizan agujas con un calibre entre 21 y 25G y podemos obtener entre 1 a 2 ml de sangre en punción única. Una vez inmovilizado el animal, se introduce la cola en agua a 37-40 °C (monitorear con un termómetro), o se expone a una fuente de calor como un colchón térmico, cuidando de no propiciar quemaduras. La cola del animal se expone al calor durante 15 s y posteriormente se realiza asepsia con un antiséptico sin alcohol, pues lo que se busca con este calentamiento es lograr la vasodilatación de las venas y el frío del alcohol al secarse produciría vasoconstricción.

Las venas dilatadas son visibles y se deberá realizar la punción en la vena caudal con el bisel de la aguja dirigido hacia arriba, en un ángulo casi paralelo a la vena. La toma deberá ser lenta y continua para evitar el colapso del vaso sanguíneo (Figura 13). Al término de la toma de muestra, se retira la aguja y se realiza hemostasia durante medio minuto con presión digital, usando una torunda de algodón seca, posteriormente se libera el animal del cepo y se reintroduce a su caja.

Es conveniente recordar que las venas caudales laterales son más superficiales que la vena dorsal, lo que las hace más accesibles y fáciles de punccionar (Lee y Goonses, 2015).



Figura 13. Toma de muestra sanguínea en la vena caudal lateral. La anestesia no es necesaria, solo hay que colocar el animal en un cepo de contención. Una vez inmovilizado, se introduce la cola en agua a 37-40 °C y se realiza asepsia.

4.4.6 Toma de muestra de la vena yugular

Para realizar este procedimiento se requiere que el animal se encuentre bajo anestesia general, colocándolo en decúbito dorsal y con la cabeza hacia el experimentador, entonces se rasura la región del cuello y se realiza asepsia. La vena por debajo de la clavícula se canaliza con una aguja de 21G o 23G, en un ángulo de 30°, y una jeringa de 0.5 o 1 ml. Retraer el émbolo suavemente para evitar el colapso de la vena. La jeringa puede estar heparinizada o contener citrato de sodio al 3.8 % para la obtención de plasma. Al término de la toma, se realiza hemostasia. Esta toma puede ser única (10 % del volumen sanguíneo, para el caso de las ratas) o repetirse cada 24 o 48 h (1 % de volumen sanguíneo) y restituir el volumen extraído, para evitar deshidratación o anemia.

4.4.7 Toma de muestra por punción cardíaca (cardiocentesis)

Este procedimiento se realiza bajo anestesia general y se considera como un procedimiento terminal (deberá aplicarse eutanasia al término del procedimiento). El animal se coloca en decúbito dorsal. Para ratón se puede utilizar una jeringa de 1 ml con una aguja de 25G, mientras que para rata se utiliza una jeringa de 3 a 5 ml con aguja de 23G.

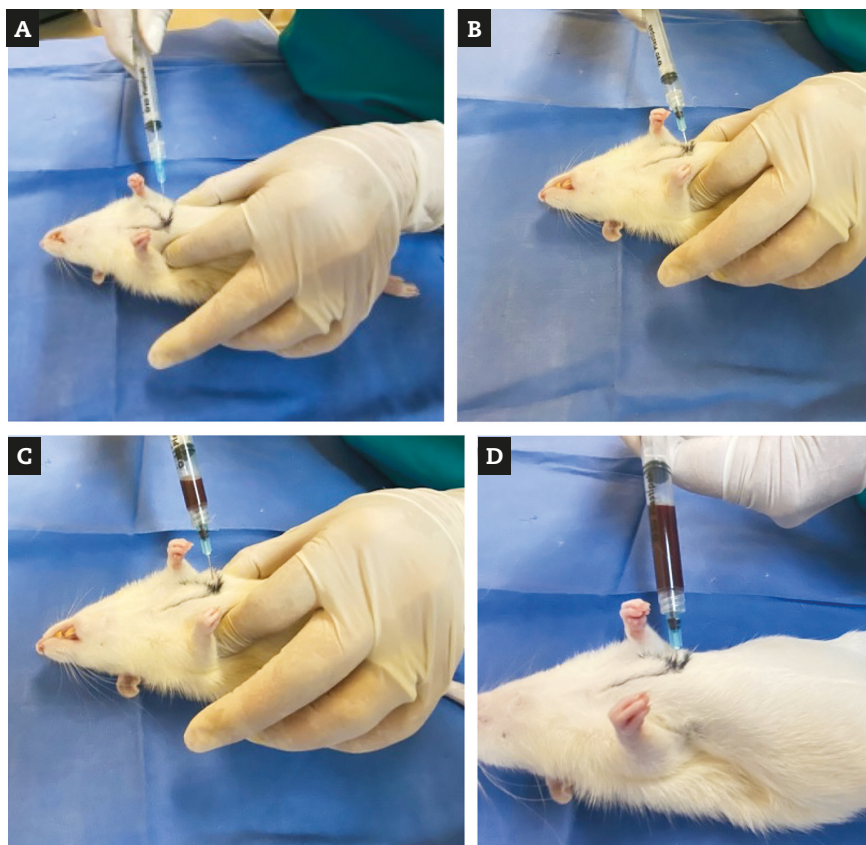


Figura 14. Cardiocentesis. Se realiza bajo anestesia general y es un procedimiento terminal. Puede realizarse al introducir la aguja a 45° , entre el cuarto y quinto espacio intercostal del lado izquierdo del animal, dirigiéndola hacia la línea media (Figura 14a). Para ambos abordajes es recomendable dejar un poco de aire en la jeringa, antes de introducir la aguja, para visualizar fácilmente la salida de sangre que bombea el corazón (Figura 14b). Por esta vía se puede obtener una gran cantidad de sangre estéril (Figura 14c). Al momento de retirar la aguja, es conveniente girarla para provocar hemostasis con el tejido muscular del corazón y evitar un severo hemopericardio (Figura 14d). A. Ubicación anatómica para la cardiocentesis. B. Dejar aire en la jeringa. C. Obtención de sangre. D. Girar la jeringa al retirarla.

La punción cardíaca se puede realizar por línea media, localizando la apófisis xifoides en el esternón e introducir la aguja en un ángulo de 30° por debajo de ella, y aspirar con cuidado y lentamente para evitar el colapso del tejido cardíaco con el bisel de la aguja.

La cardiocentesis también puede realizarse al introducir la aguja a 45°, entre el cuarto y quinto espacio intercostal del lado izquierdo del animal, dirigiéndola hacia la línea media (Figura 14a).

Para ambos abordajes es recomendable dejar un poco de aire en la jeringa, antes de introducir la aguja, para visualizar fácilmente la salida de sangre que bombea el corazón (Figura 14b). Por esta vía se puede obtener una gran cantidad de sangre estéril (Figura 14c). Al momento de retirar la aguja, es conveniente girarla para provocar hemostasis con el tejido muscular del corazón y evitar un severo hemopericardio (Figura 14d). Esta sangre se puede utilizar para determinaciones en sangre total, suero o plasma.

4.4.8 Obtención de muestra por decapitación

Para el caso de animales adultos se considera como un método *condicionado*, ya que solo se debe realizar con los animales bajo anestesia general. Si existiera una justificación científica para realizarlo sin anestesia, esta técnica debe ser aprobada por el CICUAL.

Este procedimiento requiere que el animal se encuentre bajo anestesia general. La decapitación se realiza con guillotina y la sangre se recolecta en un tubo o contenedor plástico (Fitzner Toft et al., 2006).

Conclusiones

Las técnicas para la administración de fármacos y toma de muestras se han refinado a través del tiempo para el bienestar animal.

Para elegir la vía de administración y la toma de muestra correcta, se debe considerar siempre la especie, el volumen de administración o el volumen de la toma, la frecuencia de ambas, el excipiente, etc.

Las diferentes vías de administración en este capítulo presentan ventajas y desventajas.

La vía enteral permite la administración única o diaria de fármacos disueltos en soluciones acuosas u oleosas en rata y en ratón. Su principal desventaja consiste en que algunos fármacos se pueden bioinactivar con el pH del estómago y no sería posible observar su efecto.

La vía subcutánea presenta la ventaja de administrarse en rata y ratón, en dosis únicas o múltiples de soluciones acuosas u oleosas, aunque la absorción del fármaco es más lenta que en otras vías de administración.

La vía intraperitoneal se utiliza en rata y ratón y podemos administrar fármacos no irritantes, disueltos en soluciones acuosas en dosis únicas o repetidas; la absorción es inmediata, aunque existe el riesgo de dañar algún órgano o arteria si no se administra en el ángulo adecuado.

La vía intramuscular se utiliza preferentemente en ratas y se utiliza poco, si no se realiza adecuadamente, se puede necrosar el tejido o dañar el nervio ciático.

La vía intravenosa es la que requiere mayor precisión y se utiliza menos que las demás vías de administración, en este caso se requieren fármacos disueltos en soluciones estériles libres de pirógenos.

Las tomas de muestra también presentan ventajas y desventajas entre ellas. Las tomas del seno venoso retroorbital y submandibular son relativamente sencillas y se pueden realizar en rata y ratón, sin embargo, la cantidad que se obtiene es la de un capilar y solo se puede utilizar la sangre total o la parte sérica.

La vena safena requiere mayor precisión para canalizarse y se prefiere utilizarla en ratas. En esta toma también se obtiene la cantidad de un capilar, y debe realizarse con una frecuencia de una toma cada 24 horas, para evitar la deshidratación del animal.

La cardiocentesis es un método donde se puede obtener hasta 1 ml de sangre total, sin embargo, es un procedimiento de punto final y no se puede utilizar en experimentos que requieren de varias tomas de muestra, de la misma manera que la decapitación. En la cardiocentesis se puede presentar hemólisis de la muestra y no es posible obtener plasma, solo suero.

En la toma por decapitación se pueden obtener varios ml de sangre total y se puede tomar una parte para citarla y obtener plasma.

Referencias

- Bogdanske, J. J., Hubbard-Van, S., Riley, M. R., Schiffman, B. M. (2010). *Laboratory rat procedural techniques*. CRC Press, Tylor and Francis Group, Boca Ratón, Florida.
- Bogdanske, J. J., Hubbard-Van, S., Riley, M. R., Schiffman, B. M. (2011). *Laboratory mouse procedural techniques*. CRC Press, Tylor and Francis Group, Boca Ratón, Florida.
- Christensen, S. D., Mikkelsen, L. F., Fels, J. J., Bodvarsdoóttir, T. B., Hansen, A. K. (2009). Quality of plasma sampled by different methods for multiple blood sampling in mice. *Laboratory Animals*, 43: 65-71. doi: 10.1258/la.2008.007075.
- Fitzner Toft, M. F., Petersen, M. H., Dragsted, N., Hansen, A. K. (2006). The impact of different blood sampling methods on laboratory rats under different types of anaesthesia. *Lab. Anim.*, 40(3): 261-274.
- Golde, W. T., Gollobin, P., Rodríguez, L. L. (2005). A rapid simple and human method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Laboratory Animals*, 34(9): 39-43. PMID: 16195737. doi: 10.1038/labani1005-39.
- Hem, A., Smith, A. J., Solberg, P. (1998). Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig, ferret, and mink. *Laboratory animals*, 32: 364-368. doi: 10.1258/002367798780599866.
- Horizmy, Caroline (2019). *Acclimating research animals through effective nurturing*. Taconic Models for life. (<https://www.taconic.com/taconic-insights/animal-welfare/acclimating-research-animals-nurture.html>).
- Lee, G. y Goonses, K. A. (2015). Sampling blood from the lateral tail vein of the rat. *Journal of Visualize Experiments*, 99, e52766. doi: 10.3791/52766.
- NOM-062-ZOO-1999 (Norma Oficial Mexicana) (2001). *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.
- Rusell, W. y Burch, R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co. Ltd., Londres. (<https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>).
- Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., Vasbinder, M. A. (2011). *Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors*

to Consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5): 600-613. PMID: 22330705, PMCID: PMC3189662.

Van Herck, H., Baumans, V., Brandt, C. J., Boere, H. A., Hesp, A. P., Van Lith, H. A., Schurink, M., Beynen, A. C. (2001). Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein, and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Laboratory Animals*, 35(2): 131-139. doi: 10.1258/0023677011911499. PMID: 11315161.

Capítulo 5.

Modelos experimentales para la evaluación de compuestos bioactivos con actividad antihipertensiva

Itzell Alejandra Gallardo Ortíz*

Rafael Villalobos Molina*

Luis Arias Durán**

Samuel Enoch Estrada Soto**

* Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

** Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

5.1 Introducción

En las últimas décadas, México ha transitado epidemiológicamente de las enfermedades infecciosas a las enfermedades crónicas no transmisibles, con prevalencia de las enfermedades cardiovasculares (ECVs), en las cuales la presión arterial elevada o hipertensión arterial sistémica (HAS) es el factor de riesgo más relevante para que aparezcan otros padecimientos de mayor complejidad, como el infarto agudo al miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva y el accidente vascular cerebral (Mills et al., 2020). Estas ECVs son la primera causa de morbi-mortalidad en México (INEGI, 2020).

La HAS es una enfermedad crónica, de etiología multifactorial (donde participan factores genéticos y factores ambientales), es controlable y está caracterizada por el incremento persistente en la resistencia vascular periférica (WHO, 2019), con valores superiores a 120 mmHg en la presión arterial sistólica (PAS), y valores superiores a 80 mmHg en la presión arterial diastólica (PAD) (Whelton et al., 2018). Este incremento en la presión arterial es el principal factor de riesgo para las ECVs, y es, probablemente, el más importante problema de salud pública mundial. La OMS reportó que en 2015, 1130 millones de personas en el mundo padecían HAS, con 20 % de prevalencia en mujeres y 25 % de prevalencia en hombres mayores de 20 años. En México, la prevalencia es del 18.4% para ambos sexos, la cual aumenta con la edad hasta 26.7 % en mayores de 70 años (ENSANUT, 2018; WHO, 2019). Esto significa que en México hay más de 15.2 millones de hipertensos (ENSANUT, 2018).

Se sabe que el 90-95 % de personas que padecen HAS presentan *hipertensión arterial sistémica primaria o esencial*, cuya causa es desconocida; mientras que el 5-10 % restante padece *hipertensión arterial sistémica secundaria*, en este caso sí se conoce la causa que provoca el padecimiento. La HAS es una condición común, aunque asintomática; sin embargo, es de fácil diagnóstico y en etapas iniciales es simple de tratar. Por el contrario, cuando la HAS no es atendida, conduce a varias complicaciones; la presencia de HAS aumenta el riesgo de ECVs y es independiente de otros factores de riesgo (Mills et al., 2020). La HAS conduce a mayor probabilidad de infarto agudo al miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente vascular cerebral, enfermedad renal y aceleración de la aterosclerosis (Mills et al., 2020).

Se conocen algunos factores que predisponen al individuo a padecer HAS, tales como: raza, edad, género, factores ambientales y factores hereditarios; así como la diabetes, el alcoholismo, tabaquismo y la obesidad. Sin embargo, aunque se han desarrollado gran número de investigaciones sobre el tema, los eventos que conducen a la aparición de HAS aún se desconocen; en este sentido, en el aspecto vascular se han descrito tres factores que participan en la patogénesis de HAS:

1. Disfunción endotelial,
2. Hipersensibilidad de arterias, arteriolas y venas a estímulos vasoconstrictores, y
3. Cambios estructurales en los vasos sanguíneos (Gallardo-Ortiz *et al.*, 2016).

También se conoce la participación de otros órganos como el sistema nervioso central, el corazón y el riñón (Rodríguez *et al.*, 2020).

En la actualidad existen diversos tratamientos farmacológicos y no farmacológicos para el control de la presión arterial. El tratamiento no farmacológico retrasa la evolución de la etapa de prehipertensión a la hipertensión, e incluye modificaciones del estilo de vida como la dieta, ejercicio, evitar el estrés y reducir el consumo de alcohol y tabaco. Hay ciertas pautas dietéticas que promueven el consumo de frutas, verduras, granos, productos lácteos y alimentos ricos en K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Pi , como la dieta mediterránea. Evitar el sodio en la alimentación tiene un gran potencial para la reducción de la presión arterial, así como evitar un estilo de vida estresante. En el tratamiento farmacológico existen distintos fármacos que actúan a diferentes niveles fisiológicos y con distintos mecanismos de acción, dentro de los cuales se encuentran los diuréticos, los simpaticolíticos de acción central, los bloqueadores de canales de calcio, los antagonistas adrenérgicos, los antagonistas a angiotensina II y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), entre otros (Benowitz, 2013).

5.2 Factores vasculares involucrados en la patogénesis de la hipertensión

1. La disfunción endotelial involucra la disminución de aquellos factores relajantes [óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)], así como el incremento de factores contráctiles [endotelina (ET-1), prostaglandina H_2 (PGH_2), tromboxano A_2 (TXA_2) y anión superóxido (O_2^-)], producidos por el endotelio durante la hipertensión, conduciendo a la disregulación del tono vascular (Guzik y Touyz, 2017; Oparil et al., 2018; Do Vale y Tirapelli, 2020) (Figura 1).

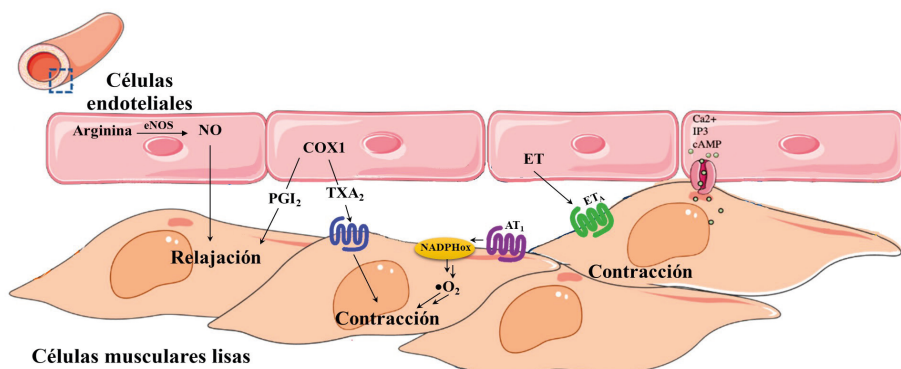


Figura 1. Esquema que representa algunos de los factores vasoactivos endoteliales y su acción sobre el músculo liso vascular subyacente en un vaso sanguíneo. Modificado de Méndez-Barbero et al., 2021.

2. La hipersensibilidad del músculo liso vascular ocurre durante la HAS, en respuesta a agentes vasoconstrictores como noradrenalina (NA), angiotensina II (Ang II) y ET-1; es decir, las respuestas contráctiles están amplificadas y hay mayor sensibilidad a agentes vasoactivos/vasoconstrictores, por lo que se ha sugerido como un elemento involucrado en la elevación y mantenimiento de la presión arterial alta. Sin embargo, la hipersensibilidad del músculo liso vascular en respuesta a la NA, se desconoce si está asociada con un incremento en la afinidad o en el número de receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -ARs), con predominancia de alguno de ellos o con cambios en los eventos post-receptor (Suzuki et al., 1994) (Figuras 2 y 3).

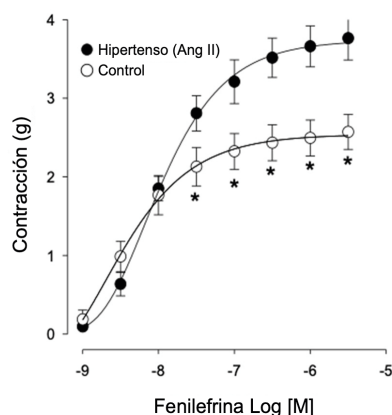


Figura 2. Respuesta contráctil a agentes vasoconstrictores (Ej., Fenilefrina, un agonista de receptores α_1 -adrenérgicos) en aorta de animales hipertensos (hipertensión inducida por infusión continua con Ang II) y controles (normotensos). Datos propios.

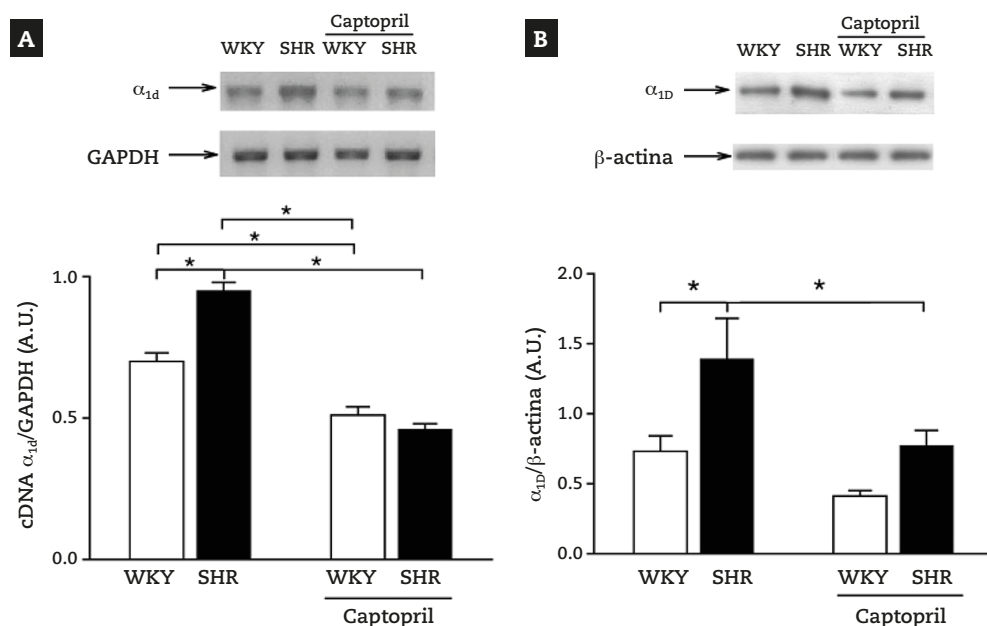


Figura 3. Datos que muestran la expresión relativa del ARNm (A) y proteína (B) para el receptor α_{1D} -adrenérgico, comparando muestras de aorta de ratas WKY y SHR de 5 semanas de edad. Tomado de Godínez-Hernández et al., 2006.

3. Los cambios estructurales en los vasos sanguíneos, también conocidos como remodelación vascular, pueden ser resultado de un fenómeno adaptativo, en el cual la pared muscular lisa (*túnica media*) se hipertrofia como respuesta al incremento en la presión arterial y, en consecuencia, la HAS predispone al individuo a otras ECVs.

Durante la remodelación vascular hay un proceso activo de cambios estructurales, relacionados con alteraciones en procesos celulares (incluyendo crecimiento, apoptosis, migración, inflamación y producción de proteínas de matriz extracelular), y que incrementa la relación *túnica media*/lumen; mientras que en la remodelación fisiológica hay cambios adaptativos, que ocurren en respuesta a cambios hemodinámicos y a la edad. Sin embargo, el aumento en la relación *túnica media*/lumen en pequeñas arterias de resistencia, debido al aumento en la masa muscular o al reacomodo inadecuado de elementos celulares y no celulares, favorecen de manera importante la fisiopatología de la hipertensión y sus complicaciones. Los cambios estructurales pueden aumentar la reactividad vascular, la cual potencia el incremento en la resistencia periférica característica de la hipertensión (Touyz, 2007) (Figura 4).

Análisis histológico en aortas

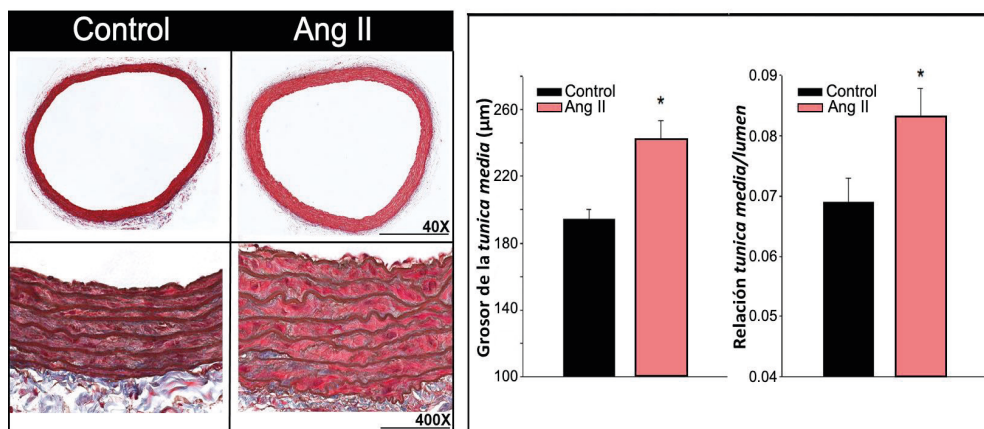


Figura 4. Análisis histológico de aortas de ratas control e hipertensas por infusión continua con Ang II durante 2 semanas. Los datos muestran hipertrofia en la *túnica media* (músculo liso vascular) de animales hipertensos. Tomado de Gallardo-Ortiz et al., 2016.

La remodelación no es exclusiva de los vasos sanguíneos, ya que se ha descrito que el mantenimiento de la hipertensión promueve la enfermedad cardíaca hipertensiva con hipertrofia ventricular (Figura 5), la cual se manifiesta clínicamente como cambios funcionales y estructurales en el corazón, asociados con disfunción ventricular sistólica y diastólica; estas alteraciones, aunadas a la hipertensión no controlada, pueden llevar al paciente a tener un alto riesgo de infarto agudo al miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebro vascular y muerte súbita (Jackson y Wenger, 2011; Rodríguez et al., 2020).

Dentro de los agentes vasoconstrictores involucrados en la hipersensibilidad de los vasos sanguíneos durante la HAS, la Ang II y la NA son de los más importantes (Foulon y De Backer, 2018; Sparks et al., 2015).

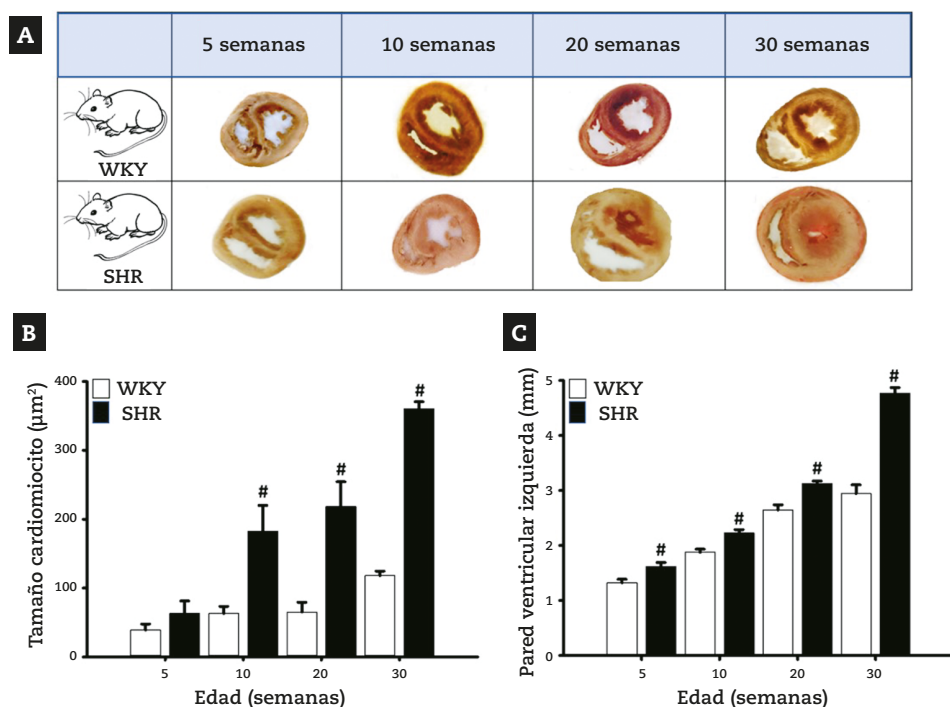


Figura 5. Imágenes que muestran la hipertrofia del músculo cardíaco asociado con hipertensión, comparando muestras de ratas WKY y SHR de diferentes semanas de edad. Tomado de Rodríguez et al., 2020.

El Sistema Renina-Angiotensina (RAS) es muy importante en el control a corto plazo de la presión arterial, puesto que condiciona la acción de factores humorales y/o neurales, tales como producción de ET_1 , la inhibición del NO o de la PGI_2 , la acción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) o de vasopresina, del TXA_2 y de diversas sustancias vasopresoras endógenas (Souza-Santos et al., 2019); además el RAS también regula la presión arterial a largo plazo, a través de la regulación del equilibrio hidroelectrolítico a nivel central y renal, lo que se traduce en la modulación de la volemia. Clásicamente, la Ang II es considerada como el efector final del sistema, y responsable de diversas respuestas cardiovasculares, incluyendo su potente efecto vasoconstrictor (Lumlertgul y Ostermann, 2020), induce hipertrofia e hiperplasia en los vasos sanguíneos (células del músculo liso vascular) y en miocitos cardíacos (Figuras 4 y 5) (Gallardo-Ortiz et al., 2016; Rodríguez et al., 2020), y estas acciones se producen a través de la estimulación de receptores AT_1 .

Por lo tanto, la vía clásica del RAS está conformada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), Ang II y el receptor AT_1 (Sparks et al., 2015). Indirectamente, también la Ang II afecta la contractilidad y el ritmo del corazón, facilitando la liberación de NA en las presinapsis noradrenérgicas desde el sistema nervioso simpático (Villalobos-Molina et al., 2008). Por lo que la Ang II está involucrada en el desarrollo y el mantenimiento de la HAS (Figura 6) (Lund et al., 2003; Villalobos-Molina et al., 2008).

Debido al origen multifactorial de la hipertensión arterial, se han desarrollado diferentes modelos experimentales para el estudio de esta patología en animales, con la intención de entender la fisiología y la fisiopatología que subyacen a la HAS. Esos modelos se han desarrollado en animales pequeños y grandes (cerdos, primates no humanos, ovejas y perros); y sin embargo, los animales pequeños (ratas y ratones) se utilizan con mayor frecuencia, debido a que ofrecen varias ventajas sobre los modelos animales más grandes, como rentabilidad, tienen un período de gestación corto y la facilidad para la manipulación genética, pero sobre todo, porque la hipertensión que desarrollan es comparable a la de humanos (Lerman et al., 2019).

Existen modelos que simulan a la hipertensión primaria o esencial, así como modelos que semejan a la hipertensión secundaria. Estos últimos pueden generarse a partir de procedimientos quirúrgicos, a través de fárma-

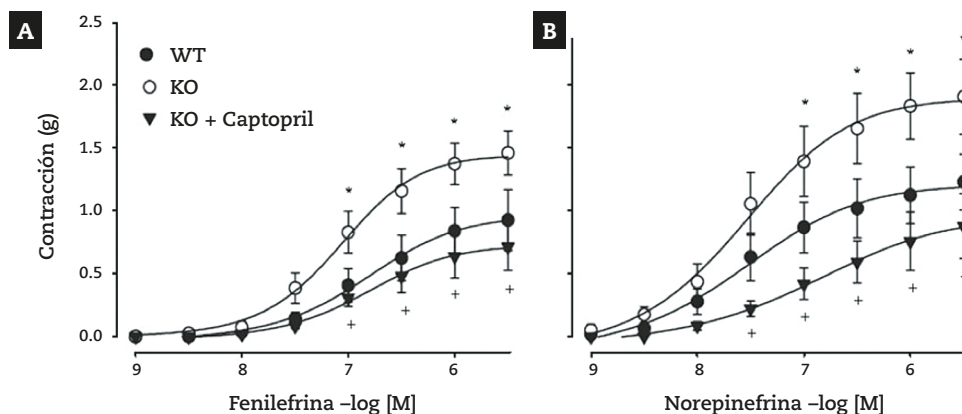


Figura 6. Datos que muestran el efecto contráctil de (a) fenilefrina y de (b) norepinefrina sobre aorta de ratones control y deficientes del gen para el receptor de aril-hidrocarburos (KO AhR). Se observa el mayor efecto de los agentes sobre la contracción. Tomado de Villalobos-Molina et al., 2008.

cos y alteraciones metabólicas (Tabla 1) (Baños, 2002). Otra de las ventajas de los modelos en roedores sobre los animales grandes, es la disponibilidad de técnicas para realizar modificaciones genéticas precisas mediante eliminaciones de genes en el animal completo o en células específicas (*knockout* y *knockdown*) o edición de genes, lo que permite llevar a cabo estudios minuciosos para dilucidar mecanismos moleculares, así como identificar nuevos blancos terapéuticos, que son verificados y/o reforzados por la gran disponibilidad de anticuerpos específicos (Lerman et al., 2019).

De acuerdo con lo descrito, la HAS es un grave problema de salud pública que predispone a las personas a la aparición de los ECVs; por ello, es importante tener modelos experimentales de la enfermedad, que permitan entender la fisiología y la fisiopatología que subyacen a la HAS, y que además permitan la evaluación de moléculas novedosas, obtenidas de la síntesis química y de los productos naturales, que tengan el potencial para ser desarrollados como agentes antihipertensivos. Con este objetivo describiremos algunos de los modelos experimentales más empleados para estudiar la HAS y para la evaluación de la actividad vasodilatadora, el mecanismo de acción funcional y el efecto antihipertensivo de moléculas nuevas o conocidas.

Tabla 1. HAS Hipertensión arterial sistémica, Ang II angiotensina II, 2K-1C dos riñones-un clip, 1K-1C un riñón-un clip, L-NAME N^ω-nitro-L-arginina-metil éster, DOCA acetato de deoxicorticoesterona. Tomado de Baños, 2002.

MODELOS	MANIFESTACIÓN CLÍNICA
Genéticos	
• Ratitas espontáneamente hipertensas (SHR)	Hipertensión primaria o esencial
• Ratitas Dahl sensibles a la sal (DSS)	Hipertensión genética, daño renal y vascular
• Rata hipertensa Fawn Hooded (FHH)	Hipertensión genética, enfermedad renal crónica Hipertensión genética, susceptibilidad a proteinuria y lesión renal
• Rata hipertensiva de Milan	Hipertensión genética, alteraciones renales, metabólicas, autonómicas, cardíacas
• Rata hipertensiva de Lyon	Hipertensión genética por interacciones ambientales
• Rata hipertensiva de Sabra	Hipertensión genética
• Rata genéticamente hipertensa	
• Roedores genéticamente modificados (knockout)	Hipertensión genética
Quirúrgicos	
• Coartación aórtica	HAS elevada, aterosclerosis
• Riñón 5/6	HAS por nefropatía, uremia
• Hipertensión arterial Goldblatt, reducción de masa renal	HAS por edad, nefropatía renovascular y aumento de Ang II
• Modelo 2K-1C, 1K-1C	HAS por vasoconstricción, aumento de Ang II y volumen
Farmacológicos	
• Ang II	HAS, nefropatía
• L-NAME	HAS, daño endotelial
• Endotelina	HAS, daño endotelial
• Alcohol	HAS, por alcoholismo crónico
Metabólicos	
• Hipertrigliceridémica	HAS moderada, dislipidemia
• DOCA + Sal	HAS elevada, sensibilidad oral

5.3 Modelo de órgano aislado

El modelo de órgano aislado es muy versátil para determinar la capacidad que tienen las muestras de prueba de relajar la contracción inducida por un agente contráctil (noradrenalina, Ang II, CaCl_2 , entre otros). Los efectos relajantes mostrados por las muestras de prueba permitirán seleccionar aquellas que tengan la potencia y eficacia significativas (comparada con el control), para ser evaluadas en modelos animales íntegros (estudio *in vivo*). Adicionalmente, este modelo permite determinar los mecanismos de acción funcional del efecto relajante inducido por las muestras de prueba, a través del uso de agonistas, antagonistas, bloqueadores o activadores de canales iónicos e inhibidores enzimáticos involucrados en los procesos de contracción/relajación del tejido vascular seleccionado.

5.3.1 Sistema de determinación del efecto vasorrelajante en órgano aislado

Los animales de experimentación se exponen en una cámara con éter etílico. Posterior a ello, la aorta torácica es disectada y limpiada del tejido conectivo, la cual se corta en anillos con longitud de 4-5 mm. Posteriormente, se montan en ganchos de acero inoxidable bajo tensión óptima de 3 g, en una cámara de incubación de órgano aislado que contiene solución de Ringer-Krebs, a temperatura constante de 37 °C y oxigenados con mezcla de O_2/CO_2 (95:5). Los cambios de tensión se registran por equipos transductores de fuerza Grass-FT03 (Astromed, West Warwick, RI, EUA) conectados a un Analizador MP100 (Biopac Instruments, Santa Barbara, CA, EUA).

Después de 60 min para el equilibrio del tejido, los anillos deberán ser estimulados con NA (0.1 μM) durante 10 min y se lavarán rápidamente con solución de Ringer-Krebs para eliminar el agente estimulante. A continuación, este procedimiento será repetido dos veces cada 30 min. Cuando es requerido, el endotelio vascular es removido mecánicamente con un estilete de acero inoxidable, y la ausencia de la capa endotelial se confirma por la falta de respuesta relajante al carbacol (1 μM) después de la última contracción. Luego, se realiza una cuarta contracción con NA 0.1 μM , y posterior a 10 min se agregan las muestras de prueba (extractos, compuestos puros o control

positivo), de forma acumulativa en concentraciones logarítmicas (Arias-Durán et al., 2021; Estrada-Soto et al., 2021).

Finalmente, la acción relajante de las muestras de prueba se determina a partir de trazos utilizando el software Acknowledge (Biopac®).

5.4 Modelo genético de hipertensión primaria o esencial

5.4.1 Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR)

La SHR es el modelo animal genético más conocido y usado que desarrolla características de la hipertensión primaria o esencial en humanos. La cepa SHR tuvo su origen en una colonia exogámica de ratas Wistar Kyoto (WKY) en Japón (Okamoto y Aoki, 1963), cuando detectaron y, posteriormente, seleccionaron unas ratas que tenían presión arterial muy por arriba de lo normal (hipertensas), sin causas conocidas que pudieran relacionarse con dieta

Tabla 2. Se muestran los valores de presión arterial sistólica, diastólica y media, y frecuencia cardíaca en ratas WKY y SHR a lo largo de 30 semanas.
Fuente: datos propios.

Edad (semanas)	Peso (kg)				SBP (mmHg)				DBP (mmHg)				MAP (mmHg)				HR (latidos/min)			
	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
WKY																				
	115.22 ± 3	153.67 ± 4	337.50 ± 1	394.50 ± 1	112.89 ± 2	133.71 ± 1	128.00 ± 2	135.09 ± 3	87.42 ± 3	111.28 ± 2	111.25 ± 1	96.91 ± 2	95.53 ± 2	118.57 ± 2	117.33 ± 2	109.27 ± 2	404.63 ± 13	315.57 ± 1	311.42 ± 7	285.73 ± 4
SHR																				
	131.33 ± 2*	178.00 ± 12*	277.75 ± 4*	345.63 ± 14	99.79 ± 3	135.71 ± 2	156.95 ± 2*	159.47 ± 2*	72.89 ± 3	108.24 ± 2	133.95 ± 2*	124.9 ± 3*	81.21 ± 3	117.0 ± 1	141.55 ± 2*	136.07 ± 2*	462.21 ± 8*	491.53 ± 7*	390.05 ± 15*	430.57 ± 10*

Valores de peso, presión arterial sistólica (SBP), presión arterial diastólica (DBP), presión arterial media (MAP) y frecuencia cardíaca (HR) de la rata Wistar Kyoto (WKY) y la rata espontáneamente hipertensa (SHR) a diferentes edades. Los valores son promedio ± SEM. *p < 0,05 vs. control para cada edad.

o con estresores ambientales (por ello el nombre de ratas espontáneamente hipertensas, SHR). Así, los investigadores cruzaron un macho con presión arterial alta y una hembra con presión arterial alta discreta, seleccionaron la progenie con hipertensión y las cruzaron entre hermanos, haciendo una cepa endogámica.

Es muy importante destacar que las SHR desarrollan la hipertensión al aumentar la edad, por lo que se recomienda medir su presión arterial a partir del destete y a lo largo de su crecimiento (Tabla 2). En términos generales, una rata SHR de 10 semanas de edad puede tener presión arterial sistólica >150 mmHg, aunque es importante cerciorarse midiendo la presión arterial desde las 4 semanas de edad (Figura 7) (Castro-Moreno *et al.*, 2012; Lerman *et al.*, 2019).

Para determinar el efecto antihipertensivo de las muestras de prueba, se forman al menos tres grupos de experimentación con 6 animales: a un grupo (G1), se le administra por vía oral el vehículo (grupo control); al grupo

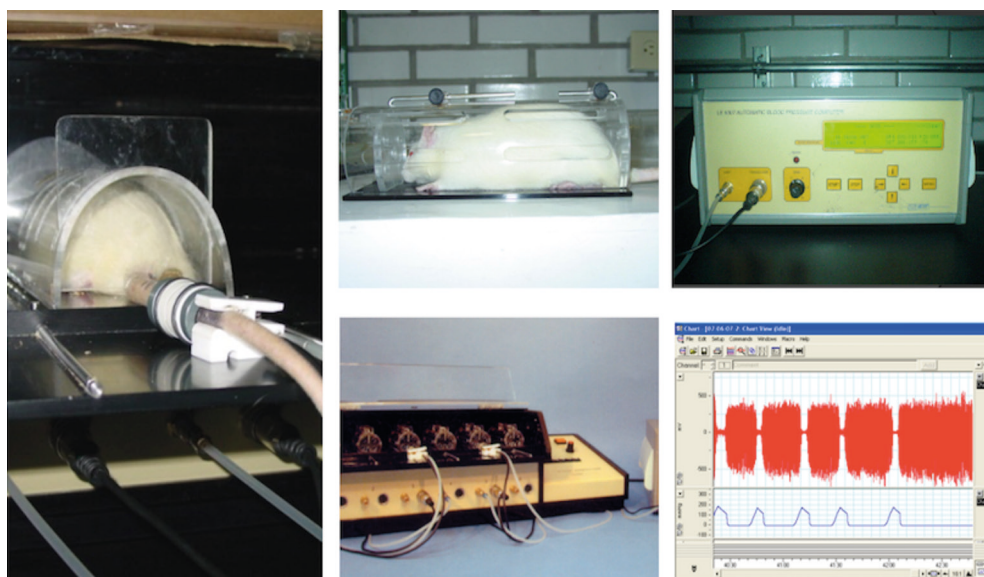


Figura 7. Imágenes que muestran un equipo de pletismografía para medir presión arterial en la cola de roedores, incluyendo el sistema de restricción de movimiento; el sensor de cola y el sistema de registro de la presión arterial. Fuente: datos propios.

de prueba (G2) se le administra por esta vía la muestra a evaluar, a una dosis experimental por lo menos (por ejemplo 50 mg/kg); y al tercero (G3), el control positivo, que se sugiere sea un fármaco utilizado en la terapéutica de la hipertensión (se sugiere administrar la dosis terapéutica). Posteriormente, se miden los siguientes parámetros: Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD), Presión Arterial Media (PAM) y Frecuencia Cardíaca (FC), esto con ayuda de un Pletismógrafo LE5007 (Harvard Apparatus), provisto del programa Chart V 4.2 de Powerlab AD Instruments. Se realizan al menos seis lecturas por animal, a los tiempos 0, 1, 3, 5 y 7 horas posteriores a la administración para determinar un efecto agudo (Arias-Durán et al., 2021; Estrada-Soto et al., 2021).

5.5 Modelos de hipertensión secundaria

5.5.1 Hipertensión provocada por inhibición de la síntesis de óxido nítrico

El endotelio vascular o *túnica íntima* es un órgano estructuralmente simple, pero funcionalmente muy complejo; se compone de una monocapa de células que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos (es decir, está en contacto con la sangre), en cavidades cardíacas, en cuerpos cavernosos, en vasos linfáticos y en cámara interior del ojo. El endotelio vascular es un sistema muy dinámico que influye, profundamente, en la bioquímica/fisiología de las células que conforman el vaso sanguíneo y en la fluidez de la sangre, pues producen sustancias vasoactivas que tienen efectos sobre las plaquetas y otros elementos formes de la sangre (Figura 1).

Debido a su ubicación estratégica en los vasos, el endotelio (*túnica íntima* que es “bañada” por la sangre e interacciona con células musculares, Figura 1) también detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas (*shear stress*) que actúan sobre la pared vascular; así como señales de mediadores químicos que son transportados en la sangre y responde a esas señales liberando sustancias vasoactivas, algunas con actividad relajante como el NO, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y la PGI₂, o con actividad vasoconstrictora como la endotelina, la Ang II, el TXA₂ y el anión superóxido (Figura 1).

Una vez sintetizado, el NO es un metabolito muy importante de la célula endotelial y de vida media corta; difunde al músculo liso vecino y activa la enzima guanilil ciclasa soluble, la cual sintetiza el segundo mensajero GMP cíclico (GMPc) a partir de GTP citosólico, que a su vez activa la proteína cinasa G (PKG), la cual activa la fosfatasa de miosina con lo que se desfosforila la cadena ligera de la miosina y provoca la relajación de la célula muscular (<https://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/no/cgmp.htm>). El NO es sintetizado por un conjunto de enzimas, las sintasas de NO, la NOS I o neuronal (NOSn), la NOS II o inducible (NOSi) y la NOS III o endotelial (NOSe) (Förstermann y Sessa, 2012). Todas las NOS usan el aminoácido esencial L-arginina como sustrato (Figura 8).

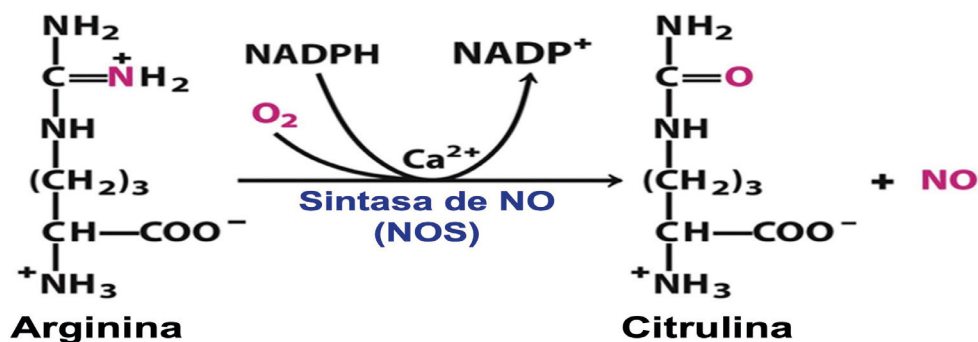


Figura 8. Síntesis de NO a partir de Arginina y la acción de NOS.

El NO tiene una función muy relevante en el tono vascular sistémico, lo que controla el flujo sanguíneo local y la presión arterial. Por lo tanto, cuando el endotelio vascular se daña o se remueve mecánicamente de las arterias y venas, o se inhibe la síntesis del NO (usando análogos de la L-arginina, como el nitro-L-arginina metil éster o L-NAME, que inhibe a las 3 sintasas), la respuesta del músculo liso vascular a diferentes agentes vasoconstrictores se incrementa (Guzmán-Hernández et al., 2015).

Lo anterior indica que en condiciones normales, el NO es un regulador vasodilatador muy importante, debido a que el músculo liso vascular está continuamente expuesto a vasoconstrictores que llegan del SNC y de la san-

gre, como: NA, serotonina, Ang II, prostaglandinas y endotelinas. Por lo tanto, el NO ejerce una importante vasodilatación tónica que reduce los efectos de vasoconstrictores locales y circulantes, contribuyendo de esta manera a regular finamente la presión arterial y el flujo sanguíneo a los órganos.

El modelo de HAS por inhibición aguda o crónica de las NOS, mediante el análogo de arginina, L-NAME, administrado vía oro-gástrica, produce vasoconstricción y aumento de la presión arterial sistémica (Figura 9).

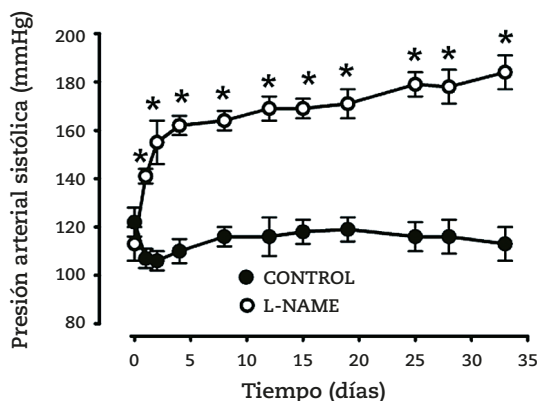


Figura 9. Efecto de L-NAME administrado *in vivo* sobre la presión arterial sistólica. Tomado de Guzmán-Hernández et al., 2015.

Además, el incremento en la presión arterial se asocia con la marcada reducción en la excreción renal de nitritos, como consecuencia de la deficiente producción de NO (Guzmán-Hernández et al., 2015). Este modelo permite investigar aquellos mecanismos asociados con el NO en el desarrollo de la HAS.

5.5.2 Hipertensión inducida por infusión continua de angiotensina II

Un modelo para contestar preguntas que involucran la acción de la Ang II es, precisamente, por infusión continua de Ang II en ratas normotensas, utilizando minibombas osmóticas de liberación continua (que se implanta vía subcutánea en el lomo del roedor, Figura 10) y controlada del fármaco a estudiar, observando el curso temporal de aparición de la hipertensión (Figura 11).



Figura 10. Imágenes que muestran la bomba miniosmótica, la implantación subcutánea en el lomo del ratón y la implantación subcutánea en el lomo de la rata. Fuente: datos propios.

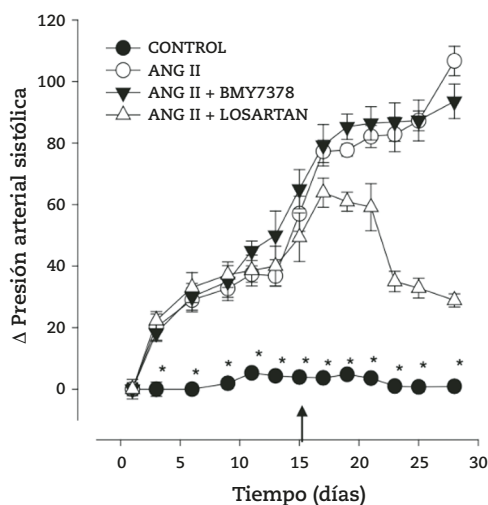


Figura 11. Curso temporal de la infusión continua con Ang II sobre la presión arterial sistólica en ratas control y en ratas con Ang II. Tomado de Gallardo-Ortiz et al., 2016.

Este modelo permite explorar diferentes condiciones experimentales, donde coexisten o se relacionan respuestas provocadas por la presencia continua, y en alta concentración, de agentes presores (Ang II, NA y otros) que modifican el desarrollo de la presión arterial, como se aprecia en la Figura 11.

Por ejemplo, la alta concentración de Ang II puede favorecer la expresión de otros receptores vasculares, y así investigar si las acciones pro-hipertensivas de la hormona involucran de manera indirecta a esos receptores (Figura 12).

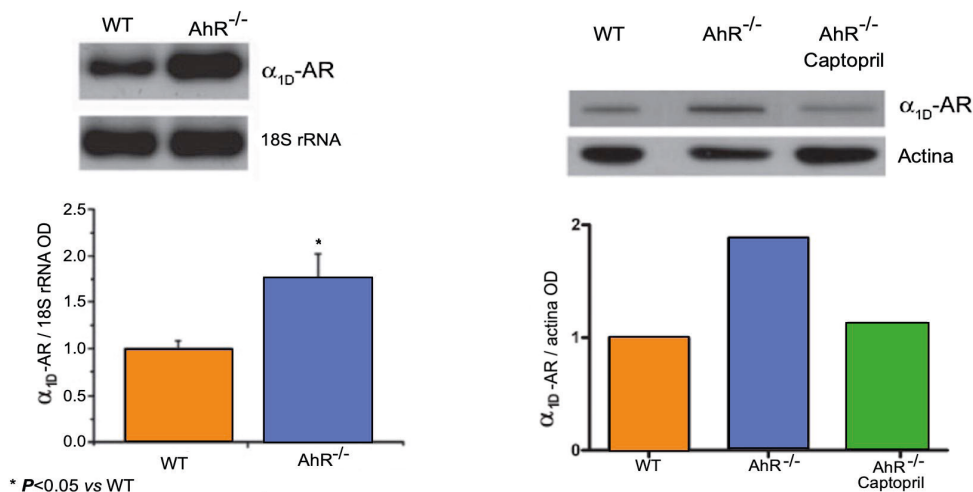


Figura 12. Datos que muestran la expresión del gen α_{1D} -adrenérgico y del receptor (proteína), comparando muestras de aorta de ratones control y deficientes del gen para el receptor de aril-hidrocarburos (KO AhR). Se observa la mayor expresión de α_{1D} -AR en los ratones KO AhR). Tomado de Villalobos-Molina et al., 2008.

5.6 Registro de la presión arterial

Las ratas se entrenan para la medición de la presión arterial en la cola, mediante un método no invasivo, con un Pletismógrafo LE5007 (Harvard Apparatus) (Figura 7). Una vez registrada la presión arterial basal, se mide la presión arterial cada 3-7 días o más (Tabla 2).

Se utilizan ratas macho de diferente edad (1 a 18 meses de edad) y cepa (Wistar, WKY y SHR). Los animales se adquieren de la casa Charles River

(Wilmington, MA, EUA) o del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. También se usan ratas Wistar para hacerlas hipertensas por liberación continua de Ang II (Figuras 10 y 11). Los animales se mantienen y usan de acuerdo a la norma oficial NOM-062-ZOO-1999, y el proyecto debe ser autorizado por el comité institucional de ética.

5.7 Evaluación de tratamientos antihipertensivos

Se utilizan ratas de diferente edad (preferentemente de 1 mes) y se emplean las vías de administración adecuadas para el fármaco a probar:

1. El fármaco disuelto en el agua para beber (por ejemplo, losartán, antagonista de AT_1R o captopril, inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina, que se aprecia en las Figuras 3, 6, 11 y 12), en las ratas Wistar, SHR y WKY, y ratones KO AhR para observar el desarrollo de la HAS.
2. Implantación de bombas osmóticas (Alzet, CA, EUA), como en la Figura 10, que liberan continuamente (de 1 a 4 semanas) el fármaco a probar: Ang II (200 ng/kg/día) para hacer hipertensas a las ratas Wistar como muestra la Figura 11; y Ang II más una segunda bomba con Losartán (antagonista de los receptores AT_1 , que también se observa en la Figura 11).
3. Administración directa de la muestra de prueba vía sonda intragástrica, que permite depositar directamente la muestra en el estómago del animal de experimentación. Para el monitoreo continuo de los cambios en la presión y en la frecuencia cardiaca, se usa la pletismografía en la cola de los animales.

5.8 Respuestas presoras *in vivo* en ratas descerebradas y desmeduladas

Las ratas se anestesian con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), se descerebran y desmedulan; se les proporciona respiración asistida (bomba de respiración Harvard Apparatus, EUA); se canulan (cánula de polietileno, PE 10) en la arteria carótida izquierda, para medir la presión sanguínea y la tasa cardiaca (Blood Pressure Analyzer, Digi-Med, KY, USA) y se canula la vena femoral derecha para la inyección de las muestras de prueba. Se generan

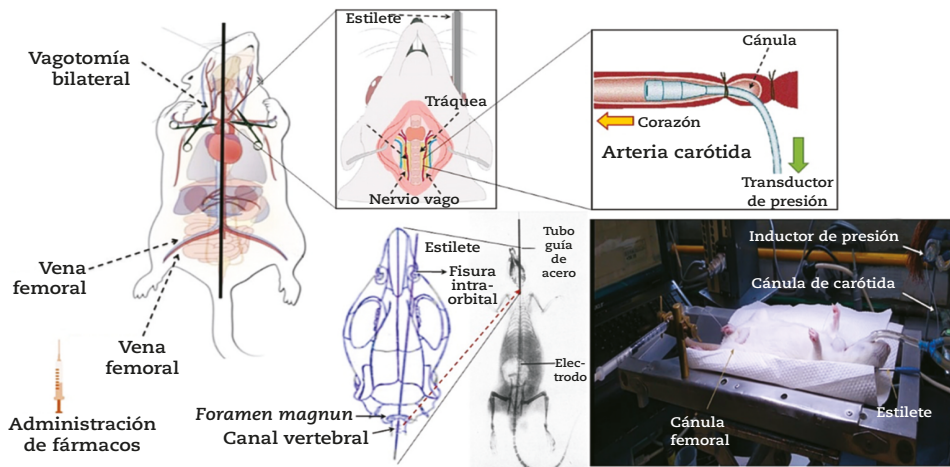


Figura 13. Modelo de ratas desmedulada y descerebrada. La imagen indica los lechos arteriales utilizados en el modelo (la arteria carótida y la vena femoral). En la radiografía se muestra un estilete de acero que se inserta a través de la órbita ocular, y el *foramen magnun* en el *foramen* vertebral para destruir mecánicamente el cerebro y el conducto de la médula espinal. Las ratas son ventiladas artificialmente, se les realiza una simpatectomía y vagotomía bilateral, y la arteria carótida derecha es ligada. Se colocan catéteres en la vena femoral y en la arteria carótida izquierdas, para la administración de fármacos y medición de la PA, respectivamente. Tomado y/o modificado de Gillespie et al., 1970; Watts et al., 2012; León-Moreno et al., 2020, y datos propios.

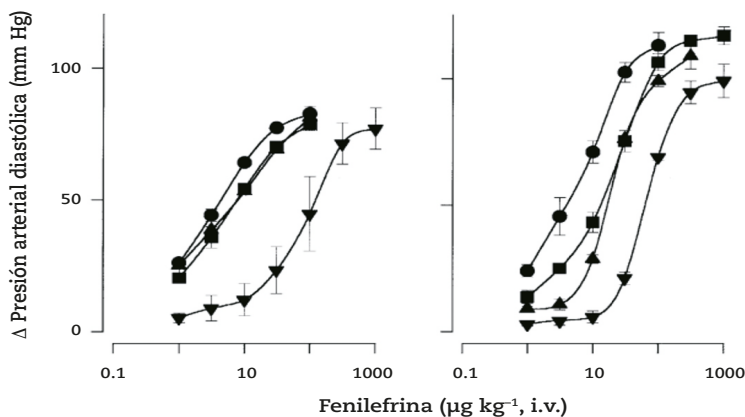


Figura 14. Gráfica que muestra el efecto presor (presión arterial diastólica) de fenilefrina en ratas desmeduladas y descerebradas y el antagonismo sobre los diferentes α_1 -ARs, en ratas Wistar de 1 mes (A) y 6 meses (B). Tomado de Ibarra et al., 1997.

curvas dosis-respuesta a agentes presores (por ejemplo, fenilefrina) con y sin antagonistas (Figura 13). Modelo de rata desmedulada y descerebrada (Gillespie y Muir, 1967). Este modelo proporciona información sobre la vascultura de resistencia de la rata (Figuras 13 y 14).

Conclusión

Los modelos presentados en esta obra son los de mayor accesibilidad en México, e incluyen el modelo genético de hipertensión primaria (SHR) y dos modelos de hipertensión secundaria, inducidos con L-NAME o con Ang II. La descripción de los métodos de registro de presión arterial y de contracción en arteria aislada, así como de la histología de vasos y corazón, permite asociar el modelo con las mediciones. Por último, el modelo de rata descerebrada y desmedulada permite experimentar con el sistema cardiovascular in toto, en ausencia de influencia del Sistema Nervioso Central, para identificar la participación periférica en la homeostasis de la presión arterial.

Referencias

- Arias-Durán, L., Estrada-Soto, S., Hernández-Morales, M., Millán-Pacheco, C., Navarrete-Vázquez, G., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Almanza-Pérez, J. C. (2021). Antihypertensive and vasorelaxant effect of leucodin and achillin isolated from *Achillea millefolium* through calcium channel blockade and NO production: functional ex vivo and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 273: 113948.
- Baños, M. G. (2002). Modelos de hipertensión experimental. *Arch. Cardiol. Mex.*, 72 (Supp. 1): 22-26.
- Benowitz, N. L. (2013). Fármacos cardiovasculares y renales. En *Farmacología Básica y Clínica*, (pp. 169-188). McGraw Hill, México, D. F.
- Castro-Moreno, P., Pardo, J. P., Hernández-Muñoz, R., López-Guerrero, J. J., Del Valle-Mondragón, L., Pastelín-Hernández, G., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R. (2012). Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin-(1-7) and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 32 (3 Pt 4): 61-69. doi: 10.1111/aap.12001 61.

Do Vale, G. T. y Tirapelli, C. R. (2020). Are reactive oxygen species important mediators of vascular dysfunction? *Current Hypertension Reviews*, 15. doi:10.2174/1573402115666190416153638.

ENSANUT (2018). Hipertensión arterial sistémica. (https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf).

Estrada-Soto, S., González-Trujano, M. E., Rendón-Vallejo, P., Arias-Durán, L., Ávila-Villarreal, G., Villalobos-Molina, R. (2021). Antihypertensive and vasorelaxant mode of action of the ethanol-soluble extract from *Tagetes lucida* Cav. aerial parts and its main bioactive metabolites. *Journal of Ethnopharmacology*, 266: 113399. doi: 10.1016/j.jep.2020.113399.

Förstermann, U. y Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33: 829-837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

Foulon, P. y De Backer, D. (2018). The hemodynamic effects of norepinephrine: far more than an increase in blood pressure! *Annals of Translational Medicine*, 6 (Suppl. 1): S25. doi: 10.21037/atm.2018.09.27.

Gallardo-Ortiz, I. A., Rodríguez-Hernández, S., López-Guerrero, J. J., Del Valle-Mondragón, L., López-Sánchez, P., Touyz, R. M., Villalobos-Molina, R. (2016). Role of α_{1D} -adrenoceptors in vascular wall remodeling during angiotensin II-induced hypertension. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 35 (3): 17-31. doi: 10.1111/aap.12035.

Gillespie, J. S. y Muir, T. C. (1967). A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 30 (1): 78-87. doi: 10.1111/j.1476-5381.1967.tb02114.x.

Gillespie, J. S., MacLaren, A., Pollock, D. (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *Br. J. of Pharmac.*, 40: 257-267.

Godínez-Hernández, D., Gallardo-Ortíz, I. A., López-Sánchez, P., Villalobos-Molina, R. (2006). Captopril therapy decreases the expression and function of α_{1D} -adrenoceptors in aorta of pre-hypertensive rats. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 26 (1): 21-29. doi: 10.1111/j.1474-8673.2005.00358.x.

Guzik, T. J. y Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, 70 (4): 660-667. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802.

Guzmán-Hernández, E. A., Villalobos-Molina, R., Sánchez-Mendoza, M. A., Del Valle-Mondragón, L., Pastelín-Hernández, G., Ibarra-Barajas, M. (2015). Early co-expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney cortex contributes to the development of N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93 (4): 299-308. doi: 10.1139/cjpp-2014-0347.

Ibarra-Barajas, M., Terrón, J. A., López-Guerrero, J. J., Villalobos-Molina, R. (1997). Evidence for an age-dependent change in functional expression of α_{1D} -adrenoceptors in the rat vasculature. *European Journal of Pharmacology*, 322 (2-3): 221-224. doi: 10.1016/s0014-2999(97)00092-7.

INEGI (2020). *Características de las defunciones registradas en México de enero a agosto de 2020*. (https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf).

Jackson, C. F. y Wenger, N. K. (2011). Cardiovascular disease in the elderly. *Revista Española de Cardiología*, 64 (8): 697-712. doi: 10.1016/j.rec.2011.05.003.

León-Moreno, L. C., Castañeda-Arellano, R., Rivas-Carrillo, J. D., Dueñas-Jiménez, S. H. (2020). Challenges and improvements of developing an ischemia mouse model through bilateral common carotid artery occlusion. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 29 (5): 104773. (<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104773>).

Lerman, L. O., T. W., Touyz, R. M., Ellison, D. H., Chade, A. R., Crowley, S. D., Mattson, D. L., Mullins, J. J., Osborn, J., Eirin, A., Reckelhoff, J. F., Iadecola, C., Coffman, T. M. (2019). Animal Models of Hypertension: A scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*, 73: e87-e120. doi: 10.1161/HYP.0000000000000090.

Lumlertgul, N. y Ostermann, M. (2020). Roles of angiotensin II as vasopressor in vasodilatory shock. *Future Cardiology*, 16 (6). (doi.org/10.2217/fca-2020-0019).

Lund, A. K., Goens, M. B., Kanagy, N. L., Walker, M. K. (2003). Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1 and mean arterial blood pressure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193: 177-187. doi: 10.1016/j.taap.2003.08.008.

Méndez-Barbero, N., Gutiérrez-Muñoz, C., Blanco-Colio, L. M. (2021). Cellular Crosstalk between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Vascular Wall Remodeling. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (14): 7284. (<https://doi.org/10.3390/ijms22147284>).

Mills, K. T., Stefanescu, A., He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. *Nature Reviews of Nephrology*, 16: 223-237. (doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2).

Okamoto, K. y Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japan Circulation Journal*, 27: 282-293. doi: 10.1253/jcj.27.282.

Oparil, S., Acelajado, M., Bakris, G. et al. (2018). Hypertension. *Nature Reviews Disease Primers*, 4: 18014. (doi.org/10.1038/nrdp.2018.14).

Rodríguez, J. E., Saucedo-Campos, A. D., Vega, A. V., Ramírez-Hernández, D., Martínez-Aguilar, L., Jiménez-Flores, J. R., Estrada-Soto, S. E., Villalobos-Molina, R., Touyz, R. M., Gallardo-Ortíz, I. A. (2020). Myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats: The role of α_{1D} -adrenergic receptors. *Journal of Hypertension*, 38 (8): 1496-1503. doi: 10.1097/HJH.0000000000002412.

Souza Santos, R. A., Oudit, G. Y., Verano-Braga, T., Canta, G., Steckelings, U. M., Bader, M. (2019). The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 316 (5): H958-H970. doi: 10.1152/ajpheart.00723.2018.

Sparks, M. A., Stegbauer, J., Chen, D., Gómez, J. A., Griffiths, R. C., Azad, H. A., Herrera, M., Gurley, S. B., Coffman, T. M. (2015). Vascular type 1A angiotensin II receptors control BP by regulating renal blood flow and urinary sodium excretion. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26: 2953-2962. doi: 10.1681/ASN.2014080816.

Suzuki, S., Takata, Y., Kubota, S., Ozaki, S., Kato, H. (1994). Characterization of the alpha-1 adrenoceptors in the mesenteric vasculature from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats: studies on vasoconstriction, radioligand

binding and postreceptor events. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268: 576-583.

Touyz, R. M. (2007). Vascular remodeling, retinal arteries, and hypertension. *Hypertension*, 50: 603-604.

Villalobos-Molina, R., Vázquez-Cuevas, F. G., López-Guerrero, J. J., Figueroa-García, M. C., Gallardo-Ortiz, I. A., Ibarra, M., Rodríguez-Sosa, M., González, F., Elizondo, G. (2008). Vascular α_{1D} -adrenoceptors are overexpressed in aorta of the aryl hydrocarbon receptor null mouse: role of increased angiotensin II. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 28 (2-3): 61-67. doi: 10.1111/j.1474-8673.2008.00418.x.

Watts, S. W., Morrison, S. F., Davis, R. P., Barman, S. M. (2012). Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacological Reviews*, 64 (2): 359-388. (<https://doi.org/10.1124/pr.111.004697>).

Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E. Jr., Collins, K., Himmel-farb, C. D., DePalma, S. M., Gidding, S., Jamerson, K. A., Jones, D. W., MacLaughlin, E. J., Muntner, P., Ovbiagele, B., Smith, S. C. Jr., Spencer, C. C., Stafford, R. S., Taler, S. J., Thomas, R. J., Williams, K. A. Sr., Williamson, J. D., Wright, J. T. Jr. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*, 71: 1269-1324. doi: 10.1161/HYP.0000000000000066.

WHO (2019). Hipertensión arterial sistémica. (https://www.who.int/health-topics/hypertension/#tab=tab_1).

Capítulo 6.

Modelos de evaluación biológica para la investigación de compuestos con potencial actividad antidiabética

Julio César Almanza Pérez*
José L. Eduardo Flores Sáenz*
Abraham Giacomán Martínez**

* Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional.

6.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades crónico-degenerativas más importantes de la humanidad. El término diabetes mellitus incluye varios síndromes indicativos de un metabolismo anormal de carbohidratos. La carga genética familiar y el estilo de vida actual, caracterizado por el sedentarismo, propician el desarrollo de esta enfermedad. Entre los factores fundamentales que promueven el desarrollo de la enfermedad se encuentra el exceso de una ingesta calórica, la obesidad, el tabaquismo y la falta de actividad física.

La diabetes es una enfermedad sistémica de carácter crónico que se caracteriza por hiperglucemia persistente. La hiperglucemia puede ser consecuencia de la disminución de la secreción de insulina por las células β , ubicadas en los islotes de Langerhans del páncreas; o bien, por la incapacidad de las células blanco para responder a esta hormona, fenómeno conocido como resistencia a la insulina (RI). Esta última produce afectaciones en el transporte e incorporación de glucosa en miocitos y adipocitos, aunque otros tipos celulares también pueden verse afectados (Liwen *et al.*, 2019; Madrigal y Guzmán, 2003; Leslie *et al.*, 2016).

Conforme progresa la enfermedad, la hiperglucemia alcanza concentraciones nocivas para los sistemas fisiológicos, provocando complicaciones micro y macrovasculares que culminan en enfermedades asociadas que pueden generar daño en el tejido nervioso (neuropatía), el riñón (nefropatía), la retina (retinopatía) y en prácticamente todo el organismo, con un pronóstico letal si no es controlada. También, con el progreso de la enfermedad, los pacientes con DM sufren complicaciones cardíacas, arteriales periféricas y cerebrovasculares, obesidad, cataratas y enfermedad de hígado graso no alcohólico (Canivell y Gomis, 2014).

6.2 Diagnóstico de la diabetes mellitus

El diagnóstico y tratamiento oportuno de la DM es proceso fundamental para detener la progresión y deterioro que produce la hiperglucemia en los diferentes órganos y tejidos. Existen diferentes criterios de diagnóstico, los cuales son revisados constantemente por diferentes asociaciones médicas a nivel mundial, destacando la Asociación Americana de la Diabetes (ADA) y

de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Uno de los criterios de diagnóstico más empleados está basado en la medición de los niveles sanguíneos de glucosa a cualquier hora del día; o bien, la medición de la glucosa en sangre con un ayuno de por lo menos ocho horas. Otro criterio de diagnóstico se basa en la prueba de tolerancia de glucosa, la cual se describe en el Apartado 6.9. También se debe considerar la medición de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), proteína sanguínea con una tasa de recambio prolongada que permite descartar los probables errores metodológicos en los criterios anteriores. Esta última permite valorar el comportamiento glicémico a lo largo de varios meses. En el siguiente esquema se muestran los diferentes criterios que pueden auxiliar en el diagnóstico de la DM, de acuerdo con los criterios del 2019 de la ADA, 2020 (Figura 1) (Mateos y Castillo, 2002).

Es importante considerar que para el diagnóstico de la DM, los síntomas en los pacientes también juegan un papel importante. Si bien parte de los signos son evaluados con los criterios de diagnóstico establecidos anteriormente, los síntomas ayudan a confirmar el diagnóstico. Entre los principales síntomas se encuentran la poliuria (emisión excesiva de orina), polifagia (apetito exagerado), polidipsia (sed excesiva) y pérdida de peso sin razón aparente (Zimmet et al., 2001).

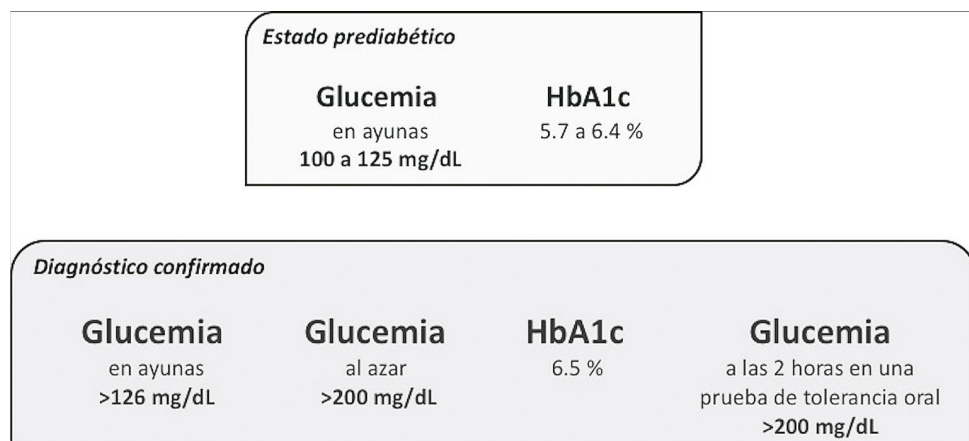


Figura 1. Criterios de diagnóstico de la Diabetes Mellitus (DM) de acuerdo con la ADA de 2019. La presencia de alguno de los signos permite establecer un estado Pre-Diabético o un diagnóstico confirmado de DM.

6.3 Epidemiología de la diabetes mellitus

La DM es una enfermedad con registros alarmantes a nivel mundial. En las últimas décadas se ha producido un incremento acelerado en su prevalencia, el cual coincide con la venta de productos industrializados. Se prevé que en los próximos años se tendrá un aumento mayor en la incidencia de dicha enfermedad, en especial en los países que se encuentran en vías de desarrollo. La incidencia en el mundo fue de 463 millones de personas en 2019, con proyecciones de 578.4 millones en 2030 y de 700.2 millones en 2045. Los países con mayor incidencia de DM son China, India y Estados Unidos de América. En México, la incidencia fue de 12.8 millones de personas en 2019, lo que representa una prevalencia del 9.9 %. Se espera que la prevalencia aumente tanto en hombres como en mujeres para el 2030 y 2045 (Cho et al., 2018; Magliano et al., 2019; Fazeli et al., 2013).

Hasta hace pocos años, la DM se diagnosticaba con mayor frecuencia en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños. Esto se debe principalmente al aumento de la obesidad y la inactividad física de niños y adolescentes (Cho et al., 2018). México ocupa el sexto lugar a nivel mundial con 12.8 millones de personas diagnosticadas en el 2019. Se ha estimado que la esperanza de vida para individuos con diabetes se reduce entre cinco y diez años. En México, la edad promedio de las personas que mueren por complicaciones de diabetes es de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años en la esperanza de vida (Hernández-Ávila et al., 2013).

6.4 Clasificación de la diabetes mellitus

La DM se clasifica principalmente en diabetes tipo 1 y tipo 2, diabetes asociada a mutaciones y algunas hiperglucemias producto de circunstancias traumáticas o secundarias a otras enfermedades.

6.4.1 Diabetes tipo 1 (DT1)

La DT1, también conocida como diabetes juvenil o diabetes insulino dependiente, es una forma de la enfermedad poco frecuente y resulta de la destrucción autoinmune de células β -pancreáticas en los islotes de Langerhans del páncreas. Existen distintas causas que pueden estar asociadas a la destrucción de los islotes: virus, agentes químicos, autoinmunidad cruzada o

incluso una predisposición genética. Sin embargo, la mayor susceptibilidad para desarrollar DT1 se encuentra en los genes del antígeno leucocitario humano clase II (HLA clase II) del cromosoma 6, que contribuyen con el 50 % del riesgo, y son asociados algunos polimorfismos genéticos en los sitios de unión del péptido (Gan et al., 2012).

Cualquiera que sea la causa asociada, en este tipo de diabetes el sistema inmune es el responsable de inducir una respuesta inflamatoria destructiva contra las células β -pancreáticas. Los marcadores de la destrucción inmune incluyen autoanticuerpos dirigidos a células de los islotes de Langerhans, así como autoanticuerpos contra insulina, contra ácido glutámico 65 y contra la tirosina fosfatasa IA-2 (Maedler, 2008). De esta forma, el sistema inmune asegura la destrucción de las células que no reconoce como propias (Madrigal y Guzmán, 2003; Jackson et al., 2001).

6.4.2 Diabetes tipo 2 (DT2)

La DT2 representa entre el 90 % y el 95 % de los casos de DM, presentando la incidencia más alta en los países de ingresos bajos. Es un problema de salud pública a nivel mundial que se ha agravado en las últimas décadas. Entre las causas que desencadenan la DT2 se encuentran diversos factores como la herencia poligénica, dislipidemia, hipertensión arterial, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria (Madrigal y Guzmán, 2003). La DT2 también se asocia estrechamente con la obesidad, ya que cerca del 90 % de las personas diagnosticadas con DT2 presentaron en el transcurso de su vida obesidad o sobrepeso, lo cual refleja la estrecha relación que existe entre ambas patologías (Kluth et al., 2011; Sharabi, 2012). Se reconoce a la resistencia a la insulina como el factor responsable de conexión entre ambos problemas médicos.

A nivel molecular, la resistencia a la insulina puede producirse por alteraciones posteriores a la unión de la hormona con el receptor de la insulina, generando así una modificación en la funcionalidad del receptor o durante la señalización. Entre las alteraciones más comunes se encuentran:

- Disminución de la actividad de tirosina cinasa del receptor.
- Aumento en el estado de fosforilación en residuos de serina-treonina (Ser/Thr) y disminución en la fosforilación en residuos de tirosina.

- Defectos en la expresión y función del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4).
- Inhibición de la PI3K por el exceso de acilglicéridos asociada a un aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr del IRS-1.
- Incremento en la desactivación de Akt, debido a un aumento en la cantidad de ceramida y diacilglicerol en células musculares (Rincón e Islas, 2016).

La resistencia a la insulina es un factor característico de la DT2, y ha sido un elemento de estudio en múltiples investigaciones orientadas al estudio de la fisiopatología o al diseño de nuevas terapéuticas.

6.4.3 Diabetes mellitus tipo MODY y gestacional

En la DM tipo MODY (*maturity-onset diabetes of the young*), la glucosinasa (hexocinasa IV) parece ser la responsable, ya que esta enzima se expresa en tejidos que regulan el metabolismo de la glucosa, como el hígado y el páncreas; y funciona como un sensor de glucosa catalizando su fosforilación. Las mutaciones en el gen de dicha enzima ocurren en este tipo de diabetes e inducen una disminución en la capacidad de fosforilar a la glucosa. Cuando las células β -pancreáticas se exponen a concentraciones altas de glucosa de manera crónica, disminuye la cantidad y la actividad de la glucosinasa; además, la glicación de factores de transcripción del gen de glucosinasa, reduce su ARNm (Madrigal y Guzmán, 2003).

La diabetes gestacional conduce a la hiperglucemia del feto. El páncreas fetal responde a la concentración de glucosa produciendo y liberando más insulina, lo que conlleva a una condición de hiperglucemia e hiperinsulinemia, lo que desarrolla varios problemas fetales, como fetopatía diabética entre otros (Coustán, 2013).

Para poder diseñar de manera racional las nuevas estrategias terapéuticas, es necesario comprender la fisiopatología de la enfermedad.

6.5 Fisiopatología de la DT2

La patogenia de la diabetes es compleja y puede estar relacionada con múltiples factores de riesgo, incluidos los antecedentes familiares, vida

sedentaria, envejecimiento, obesidad e ingesta calórica. Sin embargo, considerando que cerca del 90 % de las personas diagnosticadas con DT2 presentan o han presentado cierto grado de sobrepeso u obesidad, se considera que esta patología puede ser un factor crucial en la génesis de la diabetes mellitus. En la Figura 2 se muestran los eventos más importantes que anteceden al diagnóstico de diabetes.

El aumento en la ingesta calórica y el descenso en el gasto de energía promueve un desequilibrio energético, el cual se encuentra regulado por los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Por un lado, se regula el almacenamiento de energía en forma de grasa en el tejido adiposo e hígado, a través de la activación de PPAR- γ ; mientras que, por

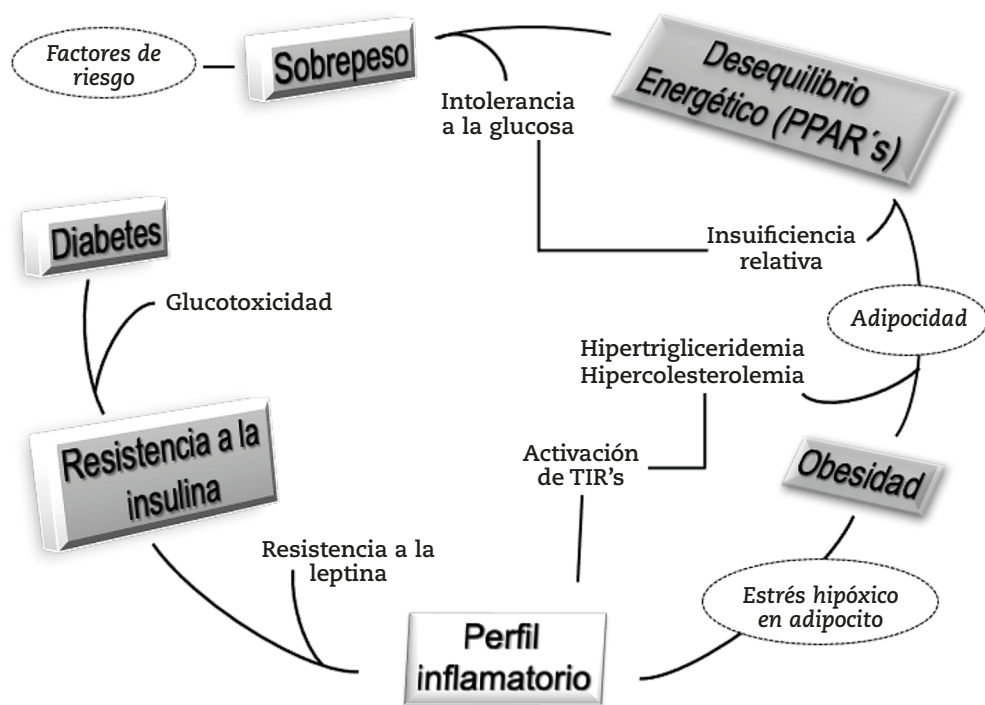


Figura 2. Génesis de la diabetes mellitus. La DT2 presenta una asociación muy estrecha con el sobrepeso y la obesidad. Se muestran los eventos más importantes que anteceden al diagnóstico de la enfermedad (léase en el sentido de las manecillas del reloj).

otro lado, se regula la oxidación de ácidos grasos en el hígado y músculo, a través de la activación de PPAR- α y PPAR- δ , respectivamente. El desequilibrio energético produce un incremento en el peso corporal y una alteración en la liberación de ácidos grasos, los cuales afectan el metabolismo general de grasas y comúnmente inducen dislipidemias (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia). Un incremento en la concentración de lípidos y carbohidratos conlleva a un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), lo cual genera productos de lipoperoxidación que finalmente desencadenan un desbalance en el estado redox del organismo. Esto a su vez provoca cambios en la señalización celular que incluye a la cascada de señalización de la insulina (Newsholme et al., 2016).

Si la ingesta excesiva de calorías se mantiene o se incrementa, el metabolismo de la glucosa también se ve alterado, manifestándose a través del fenómeno conocido como intolerancia a la glucosa, seguida de una secreción aumentada de insulina (Larsen et al., 2003; Hammarstedt et al., 2012; Díaz-Flores et al., 2004). La adipogénesis se torna en un proceso acelerado, lo cual ocasiona que otros procesos como la vascularización se afecten, y con ello se presente un déficit de oxígeno, provocando que los adipocitos entren en un estado de estrés hipóxico (Boddu et al., 2014). Estas alteraciones generan modificaciones en la tasa de síntesis de la leptina, adiponectina, y una secreción descontrolada de adipocinas (Almanza-Pérez et al., 2008), afectando diversos procesos como la vía de señalización de la insulina (Denise y Olefsky, 2015; Polonsky, 2012).

Las afectaciones provocadas por la resistencia a la insulina conllevan a una reducción del transporte de la glucosa, siendo el tejido adiposo y músculo esquelético los más afectados (Arner y Ryden, 2015). Una de las células encargadas de intensificar la señal emitida por el adipocito es el macrófago situado en el tejido adiposo (TA), el cual, bajo condiciones de hipoxia, se infiltra hacia la periferia de los adipocitos y con ello favorece la secreción de más citocinas y el reclutamiento de más macrófagos (Hosogai et al., 2007; Sell y Eckel, 2009). De esta forma, queda establecido un perfil proinflamatorio crónico de bajo grado que, con el paso del tiempo, afectará diversos órganos (Blancas-Flores et al., 2010; Castro et al., 2014), ya que la secreción de citocinas se vuelve una constante en el organismo.

La resistencia a la insulina conlleva a un estado de hiperglucemia constante que impacta directamente en el funcionamiento de diferentes órganos y tejidos. Es hasta ese momento que se diagnostica la enfermedad, momento en el cual ya existe un cierto grado de avance en complicaciones vasculares.

6.6 Principales complicaciones asociadas a la DT2

Existen diversos factores que afectan el desarrollo y progresión de la DT2, como la dislipidemia y la acumulación de metabolitos lipídicos (lipotoxicidad), deficiencia de óxido nítrico, hipertensión, reguladores y niveles de citocinas, estrés oxidativo e inflamación. La exposición persistente de los tejidos a altas concentraciones de glucosa (glucotoxicidad) puede provocar daño en el endotelio y en pequeños vasos sanguíneos (microvasculatura). A nivel microvascular genera alteraciones en tejidos y órganos, incluido el riñón (nefropatía), ojos (retinopatía), nervios y sistema nervioso central (neuropatía periférica y autónoma); mientras que a nivel macrovascular, propicia el desarrollo de aterosclerosis, cardiopatía, infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular (Manda *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2000; Zakaria *et al.*, 2017).

6.7 Fármacos para el tratamiento de DT2

Debido a la complejidad fisiopatológica de la DT2, el tratamiento farmacológico de la enfermedad es complejo. Por ello, se considera necesaria la intervención simultánea no sólo para el tratamiento de la hiperglucemia, sino para todos los factores de riesgo cardiovascular, incluidos dislipidemia, hipertensión y obesidad. Los cambios en el estilo de vida (modificaciones dietéticas y aumento del ejercicio físico) son elementos de suma importancia para mejorar la condición general del paciente. Además, es importante el uso de medicamentos que favorezcan el incremento de la secreción y acción de la insulina, y puedan detener la progresión de esta enfermedad (Ascaso, 2014). En el Cuadro 1, se describen diferentes grupos de fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2.

Las alternativas terapéuticas de las que se dispone en la actualidad tienen como principal objetivo la disminución en los niveles de glucosa, y como consecuencia disminuir o retrasar las complicaciones vasculares. Sin

Cuadro 1. Principales grupos de fármacos utilizados en el tratamiento de la DM tipo 2.

Grupo farmacológico	Efecto	Reducción en glucemia y HbA _{1c}	Ejemplo	Mecanismo de acción	Referencias
Sulfonilureas	Hipoglucémico	50 a 60 mg/dL 1.5 a 2%	Glibendámda	Bloqueador de canales de potasio ATP dependientes de las células β - pancreáticas	Ugwoke et al., 2017; Filion et al., 2019; Lv et al., 2020
Biguanidas	Anti-hiper-glucémico	60 a 70 mg/dL 1.5 a 2%	Metformina	Disminución de gluconeogénesis y gluconeogénesis	Song, 2017; Lv et al., 2020
Meglitinidas	Hipoglucémico	50 a 60 mg/dL 1.5 a 2%	Reparglinida	Inhibición de canales de potasio dependientes de ATP en las células β -pancreáticas	Kalsi et al., 2015; Li y Liu, 2017
Inhibidores de α -glucosidasa	Anti-hiper-glucémico	25 a 30 mg/dL 0.7 a 1%	Acarbosa	Inhibición enzimática de α -glucosidasas intestinales	Ezebuonyi et al., 2017; Baron, 1998; Levetan, 2007
Inhibidores de DPP-IV	Hipoglucémico	40 a 50 mg/dL 1 a 1.5%	Sitagliptina	Inhibición enzimática de DPP-IV, encargada de degradar GLP-1 y GIP.	Figueredo et al., 2016; Juillerat-Jeanneret, 2014; Akoumianakis y Antoniadis, 2017
Inhibidores de SGLT2	Hipoglucémico	30 a 40 mg/dL 0.5 a 0.7%	Dapagliflozina	Inhibición de co-transportadores de Na ⁺ /glucosa, lo que limita la reabsorción de glucosa a nivel renal.	Defronzo, 2017; Van Baar et al., 2018
Tiazolidinedionas	Anti-hiper-glucémico	39 a 65 mg/dL 1.4 a 1.8%	Pioglitazona	Agonista del receptor PPAR γ	Nanjan et al., 2018; Lee et al., 2012; Davidson et al., 2018; Lebovitz, 2019.

Abreviaturas: DPP-IV: Dipeptidil peptidasa tipo IV; SGLT2: de sus siglas en inglés Sodium-Glucose transporter type 2; mg/dL: miligramos por decilitro de sangre.

embargo, es necesario diseñar nuevos fármacos enfocados en el desequilibrio energético, factor que desencadena una serie de cambios moleculares y celulares que podrían ser considerados la base fisiopatológica de la enfermedad. En este sentido, los agonistas duales a PPARs representan una alternativa importante en el diseño de fármacos enfocados en la base fisiopatológica, mejorando niveles de glucosa, lípidos, e inhibiendo el desarrollo de un perfil proinflamatorio.

Para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, los modelos de estudio son elementos clave en la investigación científica.

6.8 Modelos murinos experimentales de diabetes

Desde finales del siglo XVIII los modelos murinos han sido ampliamente utilizados en la investigación biomédica. Los modelos animales son una herramienta útil para describir las características fisiopatológicas de la enfermedad, así como para la evaluación de potenciales agentes farmacológicos. En el campo de la farmacología son de gran utilidad para describir los efectos de compuestos de origen natural o sintético, con potencial uso terapéutico en patologías como la obesidad, la DT2, el cáncer, entre otras. De los animales más utilizados en esta práctica se encuentran los roedores, principalmente la subfamilia *Murinae*, como el ratón CD1 (*Mus musculus*) y la rata Wistar (*Rattus rattus*), los cuales requieren un cuidado relativamente sencillo y económico, además de que su tasa de reproducción es alta, obteniendo lotes de animales en un periodo relativamente corto. Asimismo, los modelos murinos comparten una similitud anatómica y genética de ~99 % con el humano, lo cual los hace ideales para la evaluación de varios aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Dutta y Sengupta, 2016) que pueden ser extrapolados al ser humano.

Existen diferentes agentes químicos que desarrollan hiperglucemia moderada a severa y producen los efectos sistémicos característicos de la DT2. Además, se han desarrollado modelos de DM en animales genéticamente modificados, que representan otra alternativa importante en la investigación científica, aunque el cuidado que demandan es alto y el costo de producción elevado. También se cuenta con diversas estrategias dietéticas que permiten desarrollar modelos animales con características semejantes a la

obesidad y la DT2. A continuación, se describen los modelos experimentales más utilizados para la investigación científica en DT.

6.8.1 Métodos químicos de diabetización murina

La estreptozotocina (STZ) y la aloxana son considerados los agentes diabetogénicos más potentes utilizados en modelos animales. Ambos son empleados como citotóxicos de células pancreáticas.

Estreptozotocina

La STZ actúa como molécula alquilante del ADN ocasionando su fragmentación y muerte celular y ha mostrado una alta selectividad por las células β -pancreáticas. De esta manera, provoca una deficiencia en la secreción de insulina y un estado de hiperglucemia crónico similar al de los pacientes con DM (Al-Awar et al., 2016). Existen diferentes estrategias de dosificación de la STZ. En una de ellas se administra una dosis única de entre 45-70 mg/kg por vía intraperitoneal. Con esta dosis de STZ, entre ocho y diez días, los animales presentan niveles de glucemia entre 180 a 200 mg/dL (Lenzen, 2008). También se sugiere la administración de dos a tres dosis de STZ con un intervalo de tiempo de cinco a ocho días entre las dosis. Finalmente, otra estrategia sugiere la administración conjunta o separada de STZ con nicotinamida, un compuesto que se utiliza como citoprotector y que evita parcialmente el efecto alquilante de la STZ en otros órganos (Szkudelski, 2012), permitiendo el desarrollo de hiperglucemia moderada. En este caso, la nicotinamida debe administrarse por vía intraperitoneal en una dosis única de 110 mg/kg de peso, 15 minutos después de la administración de STZ (Shirwaikar et al., 2004).

Aloxana

La aloxana es un agente que afecta a prácticamente todas las células pancreáticas, entre ellas las células β , y a ello se debe sus efectos en el metabolismo. Induce un efecto diabetogénico ya que inhibe a la glucosinasa, una enzima que induce la liberación de insulina del páncreas (Al-Awar et al., 2016). En ratones y ratas, la aloxana se administra en una dosis única de 70 mg/kg por vía intraperitoneal (Jasso-Villagómez et al., 2018). Después de ocho días

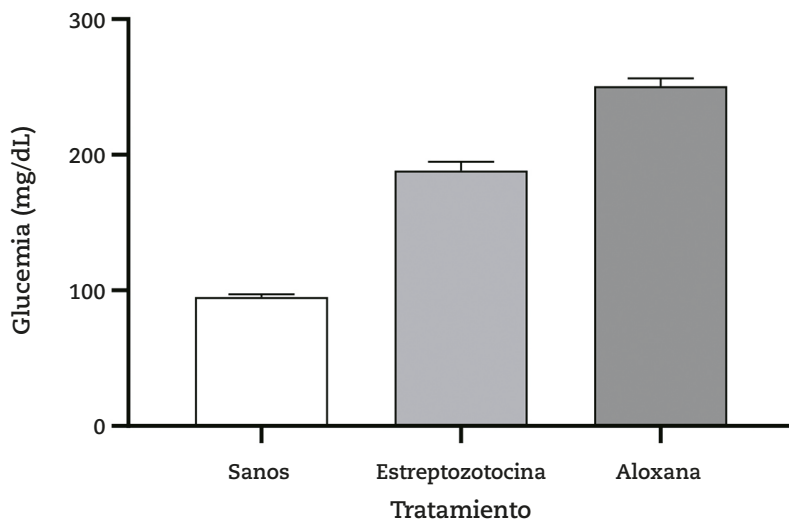


Figura 3. Niveles de glucemia en los modelos animales de hiperglucemia inducida químicamente con estreptozotocina o aloxana en ratones CD1 después de 8 días de su administración (Datos no publicados).

de su administración, los niveles de glucemia son mayores a 250 mg/dL (Figura 3) (Lenzen, 2008).

6.8.2 Modelos espontáneos y genéticamente modificados de DM

Las técnicas de biología molecular permiten generar un gran número de modelos animales útiles para el estudio de la DM y obesidad. Al modificar genes específicos, dichas técnicas permiten desarrollar modelos a medida del estudio que se quiera realizar. Por ejemplo, se pueden producir ratones que sobreexpresen o carezcan de un gen específico (Plum et al., 2005). Los tipos de manipulaciones que afectan a un gen en particular y pueden interesar para producir un modelo son:

- Sobreexpresión, que da lugar a ratones llamados transgénicos;
- Eliminación, que da lugar a ratones llamados “knock-out”; o bien,
- Reemplazo de genes (con una forma alterada), que da lugar a ratones llamados “knock-in”.

Los animales transgénicos se obtienen mediante la incorporación de un gen modificado (transgen). El transgen se incorpora de modo aleatorio en el genoma y sólo una reducida proporción de oocitos fertilizados darán lugar a una primera generación que expresa el gen de interés. Para obtener animales “knock-out” y “knock-in” se elimina, altera o sustituye el gen correspondiente en células troncales embrionarias, las cuales se introducen en un embrión precoz (en el cual se integran) dando lugar a animales quiméricos. En el ratón existen de 22 000 a 25 000 genes, de los cuales varios cientos han sido ya selectivamente modificados con el fin de investigar su función (Arias y Balibrea, 2007).

6.8.2.1 Modelos de diabetes tipo 1 (DT1)

Ratas BB

Las ratas Biobreeding (BB, por sus siglas en inglés) son animales que provienen del cruzamiento de dos linajes de ratas (Prone/Worcester) que muestran una reacción autoinmune en contra de las células pancreáticas, la cual comienza después de la pubertad, ocasionando DT1 (Mordes *et al.*, 2004). Es un modelo que muestra las características fisiopatológicas típicas de la DT1, con un origen semejante a la enfermedad humana.

Ratones Akita

El ratón Akita fue en inicio desarrollado en Akita, Japón, a partir de un ratón C57BL/6NSIc que mutó de manera espontánea el gen que codifica para la insulina 2, lo que condujo a una síntesis errónea de proinsulina. Es considerado un modelo ideal para el estudio de DT1 (Chen *et al.*, 2011).

6.8.2.2 Modelos de diabetes tipo 2 (DT2)

Rata Zucker

La mutación en el gen *fa* fue descubierta en 1961 por Lois Zucker, en un cruzamiento entre la cepa M de Merck y ratas Sherman. Son animales que heredan la obesidad como carácter autosómico recesivo. Estos roedores se caracterizan por tener una mutación en el gen que codifica para el receptor de leptina, lo que ocasiona hiperfagia, la cual —acompañada de una dieta

hipercalórica— ocasiona el desarrollo de obesidad en un tiempo relativamente corto, por lo general ocurre a las 4 semanas de edad (Phillips et al., 1996). Además de la obesidad, este modelo es útil en otras condiciones del metabolismo asociadas a la diabetes, como hiperinsulinemia, hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertensión, resistencia a la insulina (RI) e incluso infertilidad (Chaves et al., 2007; Srinivasan y Ramarao, 2007).

Ratón db/db

El gen *db* es denominado el “gen de la diabetes”, se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen que codifica para el receptor de la leptina, esto da lugar a un déficit de señalización de dicha proteína. La mutación *db/db* muestra muchas de las características fisiopatológicas de la DT2 humana (Sharma et al., 2003). La evolución de estos ratones ocurre en dos etapas, manifestando en primer lugar hiperinsulinemia a partir de los diez días de edad y hasta la semana ocho; y en segundo, hipoinsulinemia a lo largo de su vida (Like et al., 1972), reflejando quizás un agotamiento pancreático.

Ratón ob/ob

El ratón *ob/ob* fue descubierto en 1949 en el laboratorio Toscoe B. Jackson, en Maine E.U.A. Es un ratón modificado por un cambio fortuito del gen que codifica para la leptina. El ratón *ob/ob* muestra hiperfagia, obesidad, metabolismo lento, hiperinsulinemia e infertilidad ocasionados por el hipogonadismo hipogonadotrópico. Estos animales son principalmente utilizados como modelo de DT2, obesidad e infertilidad asociada a estas enfermedades (Lindström, 2007).

Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)

Se trata de una cepa endogámica de ratones originaria de Nueva Zelanda y seleccionada por obesidad poligénica. En este modelo, los animales presentan un aumento de peso desde su nacimiento y aumento de grasa corporal, que refleja predominantemente hipertrofia del tejido adiposo. La evolución de este modelo de diabetes representa un complejo fenómeno tipo indicio, en el cual la tasa de adiposidad precoz establece un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina. Los ratones NZO machos desarrollan hipertensión

cuando son sometidos a una dieta alta en grasa. A las ocho semanas de vida, a pesar de la obesidad, estos roedores permanecen con valores normales de glucemia, y con niveles plasmáticos de insulina y leptina levemente elevados. La hiperglucemia es de aparición tardía (en promedio en la semana 16) y continúa con evolución crónica una vez establecida. Como anomalías metabólicas tempranas se han documentado tanto resistencia a la insulina, como un exceso de producción de glucosa por parte del hígado (Arias y Balibrea, 2007).

Ratas Goto-Kakizaki (GK)

Este tipo de ratas desarrollan hiperglucemia moderada en etapas tempranas de la vida, por lo que es considerado un modelo de DT2 no obeso. Este modelo se desarrolló utilizando ratas Wistar que presentan rangos de hiperglucemia en el límite con valores normales, tal y como se presenta en la etapa de prediabetes, las cuales son sometidas a endogamia consecutiva para obtener una descendencia con una hiperglucemia moderada (Al-Awar et al., 2016).

Rata OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat)

En 1984, dentro de una camada de ratas LongEvans (Charles River, Canadá), se descubrió una rata con diabetes espontánea, poliuria, polidipsia y obesidad discreta. Desde entonces, se mantiene una línea de ratas procedentes de aquella en la compañía farmacéutica Otsuka y se las denomina por ello OLETF. Sus características incluyen:

- a. Un desarrollo tardío de la hiperglucemia tras 18 semanas de edad;
- b. Un curso crónico de la enfermedad;
- c. Obesidad discreta;
- d. Aparición clínica de diabetes principalmente en los machos.

Las ratas OLETF son portadoras de un alelo nulo para el gen de la colecistoquinina A (CCK-A), lo cual conlleva una capacidad disminuida para responder a las señales del tracto digestivo involucradas en la saciedad después de la ingesta de alimento (Arias y Balibrea, 2007).

Rata israelí de la arena (Psammomys obesus)

En su hábitat natural, la rata *Psammomys obesus* consume de manera habitual una dieta vegetariana; sin embargo, cuando se alimenta con dieta estándar de rata de laboratorio, consigue un fenotipo obeso, resistencia a la insulina e hiperglucemia (Ziv et al., 1999). Además, si su dieta se complementa con una dieta alta en colesterol, los roedores desarrollan hiperlipidemia y aterosclerosis (Marquí et al., 1991). Este modelo es en particular útil para abordar los efectos de la dieta y el ejercicio (Heled et al., 2002), así como el desarrollo de la DT2.

Tanto los modelos animales generados por agentes diabetógenos, como los modelos desarrollados por manipulación génica, solo permiten una aproximación a la fisiopatología de la enfermedad humana. Hasta el momento no se ha desarrollado un modelo que presente una evolución natural de la enfermedad, por ello, se ha hecho énfasis en denominar a dichos modelos como diabetes experimental, con características semejantes a tipo 2 o tipo 1. En la actualidad, se cuenta también con modelos celulares que permiten tener un mejor control de ciertas variables, y afinar la aproximación a nivel molecular. Todos los modelos biológicos ofrecen ciertas ventajas y desventajas en el desarrollo de la investigación, lo importante es identificar y seleccionar el modelo adecuado.

Entre las variables experimentales normalmente cuantificadas en modelos animales, se puede localizar la determinación en sangre de parámetros bioquímicos característicos como: glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, etc. Además, se deben realizar dos pruebas diagnósticas, claves en estos modelos: la prueba de tolerancia a la glucosa y la de sensibilidad a la insulina.

6.9 Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)

La PTGO es la prueba más utilizada para el diagnóstico de diabetes, en particular de la DT2 (Figura 4). Esta prueba evalúa la respuesta del organismo a una carga de glucosa, así como las alteraciones de su homeostasis. La prueba puede realizarse tanto en animales sanos, obesos y diabéticos, sin discriminación de sexo, cepa, edad y tipo de alimentación, lo cual puede extrapolarse al humano.

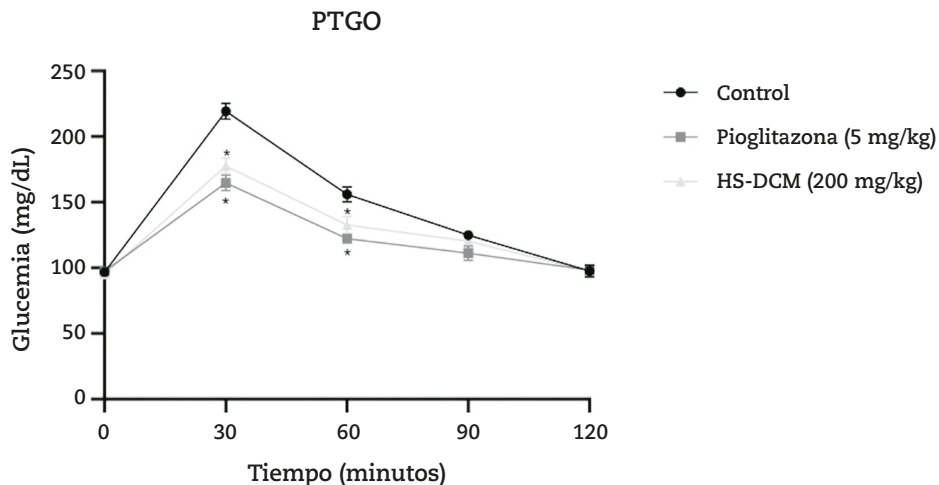


Figura 4. Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) en ratones CD1 sanos; Pioglitazona; HS-DCM: Extracto diclorometánico de *Hibiscus sabdariffa*. Media $\pm$ E.E.M. (n = 6). * Diferencia significativa respecto al control (p < 0.05) (Giacoman-Martínez et al., 2019).

Antes de comenzar la prueba (Figura 4), los animales deben estar en ayuno de máximo 12 horas; a continuación, se determina la concentración de glucosa sanguínea basal (mg/dL) (denominado tiempo 0), por el método de la deshidrogenasa a través de un glucómetro. Enseguida se administra una carga de glucosa por vía oral (2 g/kg de peso), utilizando una cánula para asegurar la administración completa. Posteriormente se determinan los niveles de glucosa en sangre durante 2 horas, cada 30 min, tomando las muestras sanguíneas de la vena caudal del animal. Como parámetro complementario, se puede calcular el área bajo la curva de los cursos temporales de las concentraciones plasmáticas de glucosa, con lo cual se puede determinar el grado de intolerancia a la glucosa.

Nota: si se está evaluando un fármaco, extracto o compuesto, éste puede ser administrado 15 minutos antes de la glucosa, con la finalidad de evaluar su potencial efecto anti-hiperglucémico (Rozman et al., 2015; Giacoman-Martínez et al., 2019).

6.10 Prueba de tolerancia a la insulina (PTI)

La prueba de tolerancia a la insulina evalúa la capacidad del organismo para responder a la insulina, así como de reincorporarse a niveles basales de glucosa. Es una prueba útil para evaluar resistencia a la insulina (RI), la cual se asocia a varias enfermedades metabólicas, como la DT2, obesidad y otras patologías como la aterosclerosis e hipertensión (Kahn y Flier, 2000).

Para iniciar esta prueba (Figura 5), se cuantifica la glucosa basal (denominada tiempo 0) en animales que deben estar en ayunas de al menos 2 horas (máximo 5 horas para evitar hipoglucemia). Posteriormente, se administra insulina murina a una dosis de 0.75 U/kg de peso, en solución de NaCl al 0.9 % por vía intraperitoneal. A continuación, se cuantifica la glucosa sanguínea de la vena caudal del animal a los 15, 30 y 60 minutos (Figura 5).

Nota: Es importante tener preparada glucosa al 20 %, ya que en caso de que se presente hipoglucemia en los animales de experimentación, se pone en riesgo la vida del animal y es necesario interrumpir el ensayo y administrar

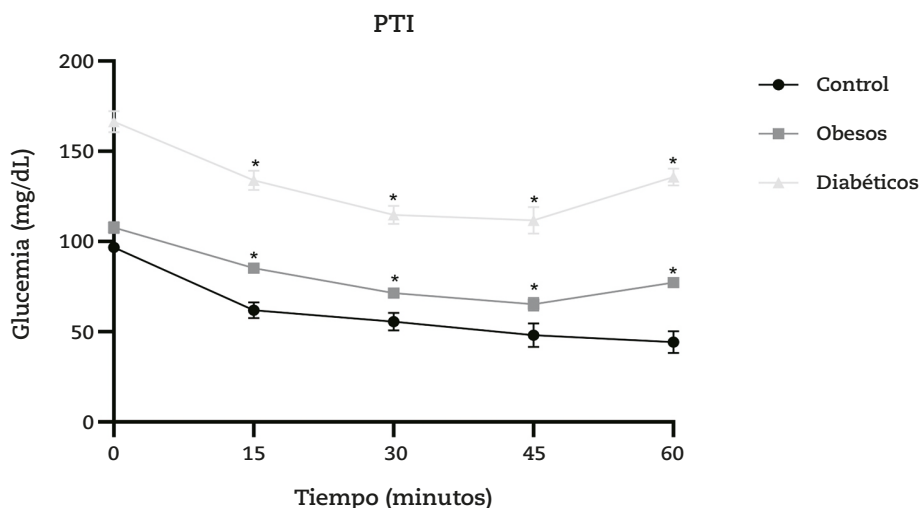


Figura 5. Prueba de tolerancia a la insulina en ratones CD1. Control: ratones sanos; Obesos: ratones con dieta alta en grasa y Diabéticos: Ratones diabetizados con aloxan. Media $\pm$ E.E.M. (n = 6). * Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$) (Datos no publicados).

la solución glucosada por vía intraperitoneal en una relación de 100 μ L por cada 20 g de peso (Nagy y Einwallner, 2018).

6.11 Modelos celulares de experimentación

Los modelos en cultivo celular son una herramienta importante para investigar con mayor profundidad los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares, permitiendo explorar vías de señalización y mecanismos de acción involucrados en el efecto farmacológico, además de identificar aspectos moleculares característicos de la fisiopatología.

Los modelos celulares nos brindan un mayor control de las variantes involucradas, como el ambiente, nutrientes y temperatura, las cuales son convenientes para la descripción de fenómenos y efectos farmacológicos.

En la actualidad se puede realizar el aislamiento y cultivo primario de prácticamente cualquier tipo celular, ya sea de humano, rata o ratón principalmente. Además, existen líneas celulares de linaje murino y humano, las cuales en muchos casos tienen la cualidad de ser “inmortalizadas”, es decir, que no detienen su proliferación, lo cual es conveniente en la experimentación, ya que se pueden proliferar y sembrar consecutivamente. Estas líneas celulares son de fácil manejo, el tiempo de cultivo y los costos son más bajos comparados contra un cultivo primario. Las marcas comerciales que ofrecen estas líneas celulares brindan un solo tipo celular, conveniente por motivos de especificidad, es decir, que los resultados serán concretos a un tipo celular.

6.11.1 Adipocitos 3T3-L1

El tejido adiposo es uno de los órganos más importantes en el metabolismo, y está involucrado tanto en la obesidad como en el desarrollo de la DT2. Dentro de las líneas celulares utilizadas en estas patologías, destacan los fibroblastos 3T3-L1 (ATCC®) (embrión, *Mus musculus*). El medio de cultivo consiste en medio DMEM (de sus siglas en inglés: Dulbecco's Modified Eagle Medium), glucosa [25 mM], aminoácidos no esenciales [0.1 mM], L-glutamina [2 mM], piruvato de sodio [1 mM], gentamicina [0.01 mg/L] y 10 % de suero fetal bovino. A este tipo celular se le puede inducir a diferenciar adipocitos, a través de un coctel de diferenciación en un solo tratamiento [10 mg/L de insulina murina, 0.5 mM isobutilmetixantina (IBMX) y 0.25 μ M

de dexametasona], bajo las siguientes condiciones: 37 °C en una atmósfera al 95 % de humedad y CO₂ al 5 %, cambiando el medio de cultivo cada dos días, por ocho días (Giacoman-Martínez *et al.*, 2019). En este tipo celular se pueden evaluar marcadores moleculares asociados a la señalización de la insulina, marcadores inflamatorios, incorporación de glucosa, adipogénesis, oxidación de ácidos grasos, etc.

6.11.2 Mioblastos C2C12

Los mioblastos C2C12 (ATCC®) (músculo, *Mus musculus*) son considerados otro modelo celular importante, ya que el músculo juega un papel fundamental en la resistencia a la insulina. El medio de cultivo consiste en medio DMEM, glucosa [25 mM], aminoácidos no esenciales [0.1 mM], L-glutamina [2 mM], piruvato de sodio [1 mM], gentamicina [0.01 mg/L] y 10 % de suero fetal bovino, bajo las condiciones siguientes: 37°C en una atmósfera al 95 % de humedad y al 5 % de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada dos días (Giacoman-Martínez *et al.*, 2019). En este tipo celular se pueden evaluar los marcadores moleculares asociados a la señalización de la insulina, incorporación de glucosa, oxidación de ácidos grasos, almacenamiento y gasto de glucógeno, contracción, etc.

6.11.3 Células pancreáticas RIN-m5F

La línea celular RIN-m5F (ATCC®) es un tipo celular de origen pancreático (células tumorales de islotes pancreáticos, *Rattus norvegicus*). Esta línea celular nos permite abordar aspectos importantes sobre este órgano secretor de insulina. El medio de cultivo adecuado es el RPMI-1640, suplementado con suero de neonato de ternera (SNT) al 10 % (v/v), L-glutamina [2 mM], piruvato de sodio [1 mM] y 20 mg/mL de gentamicina, bajo las condiciones siguientes: 37 °C en una atmósfera al 95 % de humedad y 5 % de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada 2 días (Hidalgo-Figueroa *et al.*, 2017). En este tipo celular se pueden evaluar los mecanismos asociados a la producción y liberación de insulina, estrés oxidante, etc.

6.11.4 Hepatocitos HepG2

Como todos sabemos, el hígado juega un papel muy importante en el metabolismo, la regulación de la glucosa y la resistencia a la insulina; por lo

cual, la línea celular HepG2 (ATCC®) (hepatocarcinoma humana, *Homo sapiens*) resulta útil al evaluar procesos metabólicos asociados a la DT1 y DT2. Para su cultivo se utiliza medio DMEM al 10 % de SFB, bajo las siguientes condiciones: 37 °C en una atmósfera al 95 % de humedad y 5 % de CO₂ (Xuguang et al., 2019). En este tipo celular se pueden evaluar la incorporación de glucosa, oxidación de ácidos grasos, balance del almacenamiento y gasto de glucógeno, etc.

A pesar de que estos modelos celulares provienen de un linaje inmortalizado, y en la mayoría de los casos conservan ciertas características de origen, principalmente asociadas con el cáncer, pueden ser considerados un modelo experimental adecuado para contar con aproximaciones al mecanismo molecular de acción de fármacos, extractos o compuestos.

A continuación, se describen los ensayos experimentales más comunes empleados en los modelos experimentales.

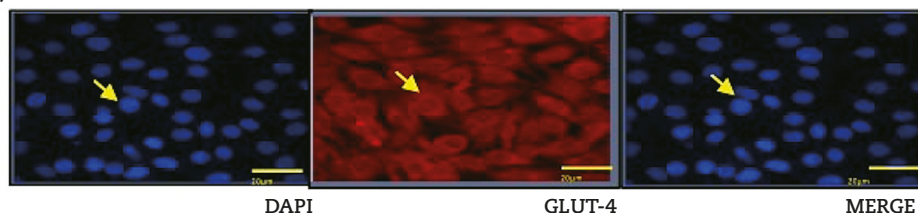
6.12 Inmunodetección de GLUT4 por microscopía confocal

La GLUT4 es una proteína importante en la incorporación de glucosa en tejidos insulino dependientes, como el músculo esquelético y tejido adiposo. La técnica consiste en la detección de este transportador y su localización en la membrana plasmática, la cual se asocia directamente con la incorporación de glucosa. El fundamento de esta técnica se basa en el marcaje de GLUT4 con un anticuerpo primario, después se adiciona un anticuerpo secundario (que se une al primario) marcado con un fluoróforo (por ejemplo, rodamina), y posteriormente se observa a través de microscopía confocal (Figura 6). Además, se pueden marcar los núcleos celulares con DAPI (del inglés 4',6-diamidino-2-phenylindole), el cual refleja la integridad nuclear (Figura 6) (Loza-Rodríguez et al., 2020; Giacomani-Martínez et al., 2021).

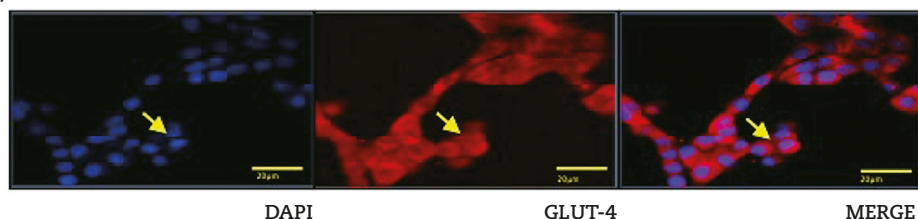
6.13 Ensayo de incorporación de glucosa

En este tipo de ensayo se puede utilizar cualquier tipo celular de interés, principalmente adipocito o miocito. Se utiliza para evaluar la incorporación de glucosa dentro de las células. La técnica consiste en el marcaje de 2-deoxiglucosa (DOG) y 3 O-metil glucosa (OMG) radioactiva (³H- o ¹⁴C), en

a) Control



b) Ácido ursólico



c) Pioglitazona

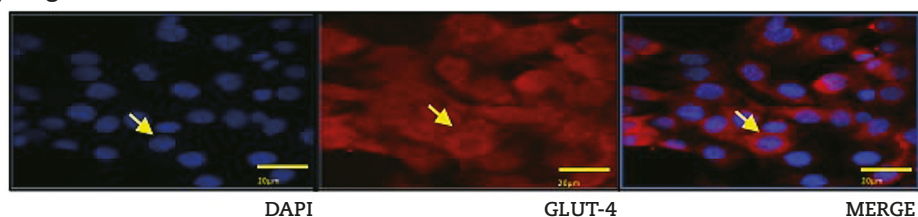


Figura 6. Translocación de GLUT4. Efecto del ácido ursólico (b) y pioglitazona (c) sobre la translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12. Izquierda: tinción de núcleos con DAPI; centro: marcaje GLUT4-rodamina e izquierda: transposición de imágenes anteriores. Imágenes de microscopía confocal a 40X (Loza-Rodríguez et al., 2020).

donde posteriormente se pueden evaluar los analitos radioactivos con un detector de radioactividad (Tanti et al., 2001). El ensayo demanda de conocimientos básicos en el manejo de radioactividad y sólo personal con licencia POE puede realizar dicho ensayo, en un laboratorio que cumpla las condiciones de seguridad adecuadas.

Otro ensayo es llevado a cabo mediante la utilización de 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-deoxiglucosa (2-NBDG), un homólogo fluorescente de la glucosa, el cual puede ser transportado por proteínas cotransportadoras de Na^+ /glucosa tipo 1 y 2 (SGLT1, SGLT2) y

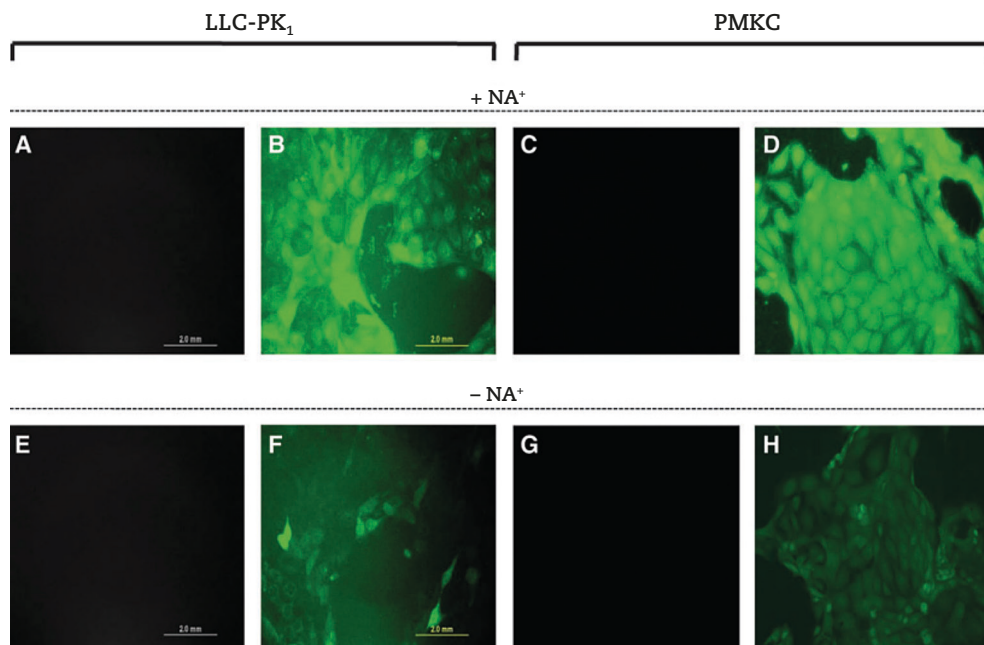


Figura 7. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la incorporación de 2-NBDG. Figuras A, B, E y F, células LLC-PK₁ (Línea celular de riñón de jabalí, ATCC); y figuras C, D, G y H, células de cultivo primario de riñón de ratón. Las células fueron incubadas por una hora a 37 °C en presencia de Na⁺ (A-D) o libre de Na⁺ (E-H); y en presencia (B, D, F y H) y ausencia (A, C, E y G) de 200 μM de 2-NBDG. Imágenes tomadas a 20X (imagen tomada de Blodgett et al., 2011).

GLUT1, principalmente localizadas en los riñones. El 2-NBDG, después de ser internalizado a las células, es detectado por microscopía de fluorescencia (Figura 7) (Blodgett et al., 2011).

6.14 Tinción con rojo oleoso

Esta técnica permite examinar el almacenamiento de lípidos en adipocitos (Figura 8). El rojo oleoso es un pigmento que se intercala de manera selectiva en los triglicéridos (principalmente encontrados en las vesículas lipídicas de los adipocitos). Adicionalmente, se puede determinar la acumulación de triglicéridos, mediante la extracción del pigmento con isopropanol con

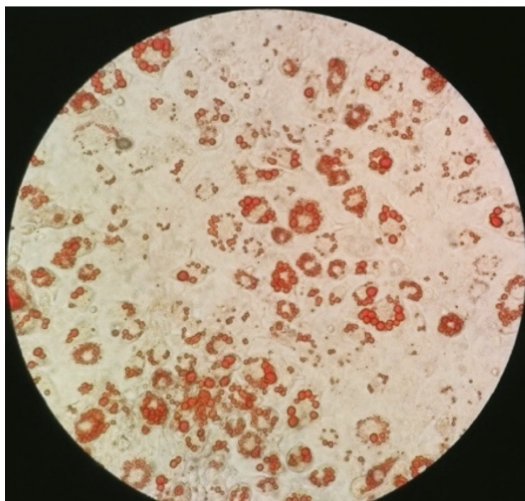


Figura 8. Almacenamiento de lípidos. Adipocitos 3T3-L1 teñidos con rojo oleoso. Microscopía óptica a 40X donde se muestran las vesículas lipídicas (Giacoman-Martínez et al., 2019).

Nonidet P-40 al 4 % y evaluarse por espectrofotometría a 510 nm (Giacoman-Martínez et al., 2019).

El modelo experimental a elegir es fundamental. Los objetivos deben ser planteados antes de comenzar el o los experimentos, los cuales deben de dar respuesta a la hipótesis planteada. A continuación, se muestra el Cuadro 2, que servirá al lector como una guía práctica en la toma de decisión al elegir modelos experimentales, ya sean animales o celulares.

Conclusión

Los modelos de experimentación juegan un papel importante en la comprensión y descripción de los procesos fisiopatológicos, tanto a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, además de ser útiles en el desarrollo de fármacos. Tanto los modelos animales como celulares presentan ciertas ventajas y desventajas. Los resultados obtenidos a partir de los modelos de experimentación deben ser interpretados de manera correcta, ya que ningún modelo experimental puede ofrecer una similitud total respecto a la patología

Cuadro 2. Modelos animales experimentales de enfermedades asociadas al síndrome metabólico.

Patología Experimental Modelo	DT2	DT1	Obesidad	Obesidad / DT2
Ratas BB	–	++	–	–
Ratones Akita	–	++	–	–
Rata Zucker	++	–	+	++
Ratón <i>db/db</i>	++	–	–	+
Ratón <i>ob/ob</i>	+	–	++	++
Ratón obeso de Nueva Zelanda	+	–	++	++
Ratas Goto–Kakizaki	+	–	–	–
Rata OLETF	++	–	+	+
Rata israelí de la arena	++	–	+	++
Modelos genéticamente modificados	*	*	*	*
Modelo celular	DT2	DT1	Obesidad	Obesidad/ DT2
Adipocitos 3T3–L1	++	–	++	++
Mioblastos C2C12	++	–	+	+
Células pancreáticas RIN–m5F	++	++	–	–
Hepatocitos HepG2	++	–	+	+

+ Recomendado, ++ Muy recomendado, * Específico, – No recomendado.

en humanos. No existe el modelo ideal, la selección de éste depende de las variables a evaluar. Los ensayos *in vitro* ofrecen particularidades que serían difíciles de explorar en un modelo animal, principalmente en la descripción a nivel molecular, “disectar” cascadas de señalización y mecanismos de acción con mayor precisión, además de que nos permite tener un mejor control de las variables. Mientras que el modelo animal permite evaluar en un sistema integral, aprovechando la interacción de todos los sistemas, pero con un menor control de las variables. La selección del modelo y el ensayo es fundamental, y dependerá del objetivo de investigación, así como de los alcances del proyecto.

Referencias

- Akoumianakis, I. y Antoniadis, C. (2017). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors as novel regulators of vascular disease. *Vascular Pharmacology*, 96-98 (7): 1-4. doi.org/10.1016/j.vph.2017.07.001
- Al-Awar, A., Kupai, K., Veszelka, M., Szucs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Torok, S., Posa, A., Varga, C. (2016). Experimental Diabetes Mellitus in different animal models. *Journal of Diabetes Research*, 2016 (9051426): 1-12. doi: 10.1155/2016/9051426.
- Almanza-Pérez, J. C., Blancas-Flores, G., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F. J., Cruz, M. (2008). Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gaceta Médica de México*, 144 (6): 535-542. (https://www.anmm.org.mx/GMM/2008/n6/68_vol_144_n6).
- Amaya, A. y Marthe, M. (2008). Rat Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinología y Nutrición*, 55 (5): 217-222. doi: 10.1016/S1575-0922(08)70670-3.
- American Diabetes Association (2020). Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes, 2020. *Diabetes Care*, 43 (Suppl. 1): S14-S31. doi: 10.2337/dc20-S002.
- Arias-Díaz, J. y Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*, 22 (2): 160-168. (<http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3869>).
- Arner, P. y Ryden, M. (2015). Fatty acids, obesity and insulin resistance. *Obesity Facts*, 8 (2): 147-155. doi: 10.1159/000381224.
- Ascaso, J. F. (2014). Diabetes Mellitus Tipo 2: Nuevos Tratamientos. *Medicina Clínica*, 143 (3): 117-123. doi: 10.1016/j.medcli.2013.05.041.
- Baron, A. D. (1998). Postprandial Hyperglycaemia and α -Glucosidase Inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 40 (Suppl.): 51-55. doi: 10.1016/s0168-8227(98)00043-6.
- Blancas-Flores, G., Almanza-Pérez, J. C., López-Roa, R., Alarcón-Aguilar, F. J., García-Macedo, R., Cruz, M. (2010). La obesidad como un proceso inflamato-

rio. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 67: 88-97. (http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462010000200002).

Blodgett, A. B., Kothinti, R. K., Kamyshko, I., Petering, D. H., Kumar, S., Tabatabai, N. M. (2011). A fluorescence method for measurement of glucose transport in kidney cells. *Diabetes Technol. Ther.*, 13 (7): 743-751. doi: 10.1089/dia.2011.0041.

Boddu, N. J., Theus, S., Luo, S., Wei, J. Y., Ranganathan, G. (2014). Is the lack of adiponectin associated with increased ER/SR stress and inflammation in the heart? *Adipocyte*, 3 (1): 1018. doi: 10.4161/adip.26684.

Canivell, S. y Gomis, R. (2014). Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity Reviews*, 13 (4-5): 403-407. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.020.

Castro, A. V., Kolka, C. M., Kim, S. P., Bergman, R. N. (2014). Obesity, insulin resistance and comorbidities - Mechanisms of association. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia y Metabologia*, 58 (6): 600-607. doi: 10.1590/0004-2730000003223.

Chaves, F., Martínez-Hervás, S., García-García, A. (2007). ¿Cómo diseñar un estudio genético? Extracción de ADN y ARN. *Avances en Diabetología*, 23 (6): 413-418. (<http://www.avancesendiabetologia.org/revista/revistaVerArticulo.asp?i-drevista=16&idArticulo=193&pa=buscador>).

Chen, H., Zheng, C., Zhang, X., Li, J., Li, J., Zheng, L., Huang, K. (2011). Apelin alleviates diabetes-associated endoplasmic reticulum stress in the pancreas of Akita mice. *Peptides*, 32(8): 1634-39. doi: 10.1016/j.peptides.2011.06.025.

Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., Da Rocha-Fernandes, J., Ohlroge, A. W., Malanda, B. (2018). IDF Diabetes atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138: 271-281. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.

Coustan, D. R. (2013). Gestational diabetes mellitus. *Clin. Chem.*, 59 (9): 1310-21. doi: 10.1373/clinchem.2013.203331. Epub 2013 Mar 27. PMID: 23536513.

Davidson, M., Donald, M., Laurent, A., Krewski, D. (2018). Thiazolidinedione drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus: past, present and future. *Critical Reviews in Toxicology*, 48 (1): 52-108. doi: 10.1080/10408444.2017.1351420.

DeFronzo, R. (2017). Combination therapy with GLP-1 receptor agonist and SGLT2 inhibitor. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 19 (10): 1353-1362. doi: 10.1111/dom.12982.

Denise, L. y Olefsky, J. (2015). Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nature Reviews Endocrinology*, 12 (1): 15-28. doi: 10.1038/nrendo.2015.189.

Díaz-Flores, M., Baiza-Gutman, L., Ibáñez-Hernández, M., Pascoe-Lila, D., Guzmán-Greenfel, A., Kumate-Rodríguez, J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Médica de México*, 140 (4): 437-447. (http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0016-38132004000400014&lng=es&nrm=iso&tlng=en).

Dutta, S. y Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Science*, 152: 244-248. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025.

Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-Induced Mitochondrial Superoxide Overproduction Activates the Hexosamine Pathway and Induces Plasmogen Activator Inhibitors-1 Expression by Increasing Sp1 Glycosylation. *PNAS*, 97 (22): 12222-12226. doi: 10.1073/pnas.97.22.12222.

Ezebuonyi, M., Jimoh, A., Ambush, E., Nguyen, A., Summers, B., Ozah, M., John-Clifford, O., Obih, P. (2017). Evaluation of selected medicinal herbs for antidiabetic activity via alpha-glucosidase inhibition. *International Journal of General Medicine*, 6(5): 59-64. (<https://ia600600.us.archive.org/1/items/7.IJGMPEvaluationOfSelectedMedicinalHerbsForAntidiabeticActivityDr.PatienceObih/7.%20IJGMP%20-%20Evaluation%20of%20Selected%20Medicinal%20Herbs%20for%20Antidiabetic%20Activity%20-%20Dr.%20Patience%20Obih.pdf>).

Fazeli, F. S., Van der Aa, M., Van der Vorst, M., Knibbe, C. A., De Boer, A. (2013). Global trends in the incidence and prevalence of type 2 Diabetes in children and adolescents: A systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia* 56 (7): 1471-1488. doi: 10.1007/s00125-013-2915-z.

Figueredo, E., Félix, A., Pérez, M. L., Batista, Y., Peña, Y. (2016). Inhibitors of Dipeptidil Peptidase 4 new pharmacologic strategic in the Diabetes Mellitus Type 2. *Revista Cubana de Medicina*, 55 (3): 239-256. (<https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubmed/cm-2016/cm163f.pdf>).

Filion, K., Douros, A., Azoulay, L., Yin, H. (2019). Sulfonylureas as initial treatment for Type 2 Diabetes and the risk of adverse cardiovascular events: A population based cohort study. *The British Pharmacological Society*, 85: 2378-2389. doi: 10.1111/bcp.14056.

Gan, M., Albanese-O'Neill, A., Haller, M. (2012). Type 1 diabetes: Current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 42 (10): 269-291. doi: 10.1016/j.cppeds.2012.07.002.

Giacoman-Martínez, A., Alarcón-Aguilar, F. J., Zamilpa-Álvarez, A., Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., García-Macedo, R., Román-Ramos, R., Almanza-Pérez, J. C. (2019). Triterpenoids from *Hibiscus sabdariffa* L. with PPAR δ / γ Dual Agonist Action: In Vivo, in Vitro and in Silico Studies. *Planta Médica*, 85 (5): 412-423. doi: 10.1055/a-0824-1316.

Giacoman-Martínez, A., Alarcón-Aguilar, F. J., Zamilpa-Álvarez, A., Huang, F., Romero-Nava, R., Román-Ramos, R., Almanza-Pérez, J. C. (2021). α -amyrin induce GLUT4 translocation mediated by AMPK and PPAR δ/γ in C2C12 myoblasts. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2021: 1-8. doi: 10.1139/cjpp-2021-0027.

Hammarstedt, A., Graham, T., Kahn, B. (2012). Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. *Diabetology and Metabol Syndrome*, 42: 4:42. doi: org/10.1186/1758-5996-4-42.

Heled, Y., Shapiro, Y., Shani, Y., Morán, D., Langzam, L., Braiman, L., Sampson, S., Meyerovitch, J. (2002). Physical exercise prevents the development of type 2 diabetes mellitus in *Psammomys obesus*. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 282 (2): E370-375. doi: 10.1152/ajpendo.00296.2001.

Hernández-Ávila, M., Gutiérrez Juan, P., Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*, 55 (2): S129-136. (<http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v55s2/v55s2a9.pdf>).

Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S., Giles-Rivas, D., Alarcón-Aguilar, F. J., León-Rivera, I., Giacoman-Martínez, A., Miranda-Pérez, E., Almanza-Pérez, J. C. (2017). Discovery of new dual PPAR γ -GPR40 agonists with robust antidiabetic activity: Design, synthesis and in combo

drug evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90: 53-61. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.033.

Hong, C., Chenghong, Z., Xin, Z., Jianshuang, L., Jiong, L., Ling, Z., Kun, H. (2011). Apelin alleviates diabetes-associated endoplasmic reticulum stress in the pancreas of Akita mice. *Peptides*, 32 (8): 1634-1639. doi: 10.1016/j.peptides.2011.06.025.

Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., Shimomura, I. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56 (4): 901-911. doi: 10.2337/db06-0911.

Jackson, W., Hofman, P., Robinson, E., Elliot, R., Pilche, C., Cutfield, W. (2001). The Changing presentation of children with newly diagnosed type 1 Diabetes Mellitus. *Pediatric Diabetes*, 2 (4): 154-159. doi: 10.1034/j.1399-5448.2001.20403.x.

Jasso-Villagómez, E. I., García-Lorenzana, M., Almanza-Pérez, J. C., Fortis-Barrera, A., Blancas-Flores, G., Román-Ramos, R., Prado-Barragán, L., Alarcón-Aguilar, F. J. (2018). Beetle (*Ulomoides dermestoides*) fat improves diabetes: Effect on liver and pancreatic architecture and on PPAR γ expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51 (6): 1-12. doi: 10.1590/1414-431x20187238.

Juillerat-Jeanneret, L. (2014). Dipeptidyl Peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for type 2 diabetes and what else? *Journal of Medicinal Chemistry*, 57 (6): 2197-2212. doi: 10.1021/jm400658e.

Kahn, B. y Flier, J. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106 (4): 473-481. doi.org/10.1172/JCI10842.

Kalsi, A., Singh, S., Taneja, N., Samiksha, K., Shalini, M. (2015). Current treatments for type 2 diabetes, their side effects and possible. *International Journal of Pharmacy and Pharmacology Science*, 7 (3): 13. (<https://ijpsr.com/archives-2/>).

Kluth, O., Mirhashemi, F., Scherneck, S., Kaiser, D., Kluge, R., Neschen, S., Joost, H., Schürmann, A. (2011). Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: Role of forkhead box O1

(FOXO1) in glucose-induced β -cell failure. *Diabetologia*, 54 (3): 605-616. doi: 10.1007/s00125-010-1973-8.

Larsen, P., Jensen, P., Sorensen, R., Larsen, L., Vrang, N., Wulff, E., Wassermann, K. (2003). Differential influences of peroxisome proliferator activated receptors- α and γ on food intake and energy homeostasis. *Diabetes*, 52 (9): 2249-2259. doi: 10.2337/diabetes.52.9.2249.

Lebovitz, H. (2019). Thiazolidinediones: The forgotten diabetes medications. *Current Diabetes Reviews*, 19 (12): 1-13. doi: 10.1007/s11892-019-1270-y.

Lee, J., Donghyun, K., Jonghyun, C., Hyounjeong, C., Jae-Ha, R., Jinhyun, J., Eun-Jin, P., Seon-Hee, K., Sunyoung, K. (2012). Dehydrodiconiferyl alcohol isolated from *Cucurbita moschata* shows anti-adipogenic and anti-lipogenic effects in 3t3-l1 cells and primary mouse embryonic fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (12): 8839-8851. doi: 10.1074/jbc.M111.263434.

Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51 (2): 216-226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7.

Leslie, D., Palmer, J., Schloot, N., Lernmark, A. (2016). Diabetes at the cross-roads: Relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. *Diabetologia*, 59 (1): 13-20. doi: 10.1007/s00125-015-3789-z.

Levetan, C. (2007). Oral antidiabetic agents in type 2 diabetes. *Current Medical Research and Opinion*, 23 (4): 945-952. doi: 10.1185/030079907x178766.

Like, A., Lavine, R., Poffenbarger, P., Chick, W. (1972). Studies in the diabetic mutant mouse. VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. *American Journal of Pathology*, 66 (2): 193-224. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2032492/pdf/amjpathol00550-0005.pdf>).

Lindström, P. (2007). The physiology of obese-hyperglycemic mice (ob/ob mice). *Scientific World Journal*, 7: 666-685. doi: 10.1100/tsw.2007.117.

Liwen, Z., Shulan, S., Yue, Z., Jianming, G., Sheng, G., Dawei, Q., Zhen, O., Jin-Ao, D. (2019). Mulberry leaf active components alleviate type 2 diabetes and its liver and kidney injury in db/db mice through insulin receptor and TGF- β /Smads signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 112: 108675. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108675.

Li, X. y Liu, Z. (2017). Pharmacogenetic factors that affect drug metabolism and efficacy in type 2 diabetes mellitus. *Drug Metabolism in Diseases*, :157-179. doi.org/10.1016/B978-0-12-802949-7.00007-9.

Loza-Rodríguez, H., Estrada-Soto, S., Alarcón-Aguilar, F. J., Huang, F., Aquino-Jarquín, G., Fortis-Barrera, A., Giacomán-Martínez, A., Almanza-Pérez, J. C. (2020). Oleanolic acid induces a dual agonist action on PPAR γ / α and GLUT4 translocation: A pentacyclic triterpene for dyslipidemia and type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 883: 173252. doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173252.

Lv, W., Wang, X., Xu, Q., Lu, W. (2020). Mechanisms and characteristics of sulfonylureas and glinides. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20: 37-56. doi: 10.2174/1568026620666191224141617.

Madrigal-Bujáidar, E. y Guzmán-Juárez, N. (2003). Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 28 (2): 113-117. (<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=10136>).

Maedler, K. (2008). Beta cells in type 2 diabetes. A crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10 (5): 408-420. doi: 10.1111/j.1463-1326.2007.00718.x.

Magliano, D., Rakibul, M. I., Barr, E., Gregg, E., Pavkov, M., Harding, J., Tabesh, M., Koye, D., Shaw, J. (2019). Trends in incidence of total or type 2 diabetes: systematic review. *The BMJ*, 366: 1-12. doi.org/10.1136/bmj.l5003.

Manda, G., Checherita, A. L., Comanescu, M. V., Hinescu, M. E. (2015). Redox signaling in diabetic nephropathy: hypertrophy versus death choices in mesangial cells and podocytes. *Mediators of Inflammation*, 2015: 1-13. doi: 10.1155/2015/604208.

Marquié, G., Hadjiisky, P., Arnaud, O., Duhault, J. (1991). Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *The American Journal of Medicine*, 90 (6A): 55S-61S. doi: 10.1016/0002-9343(91)90419-x.

- Mateos-Santa Cruz, N., Castillo-Zacarías, R. (2002). Tratamiento farmacológico para la Diabetes Mellitus. *Revista del Hospital General Dr. M. Gea González*, 5 (1): 33-41. (<https://www.medigraphic.com/pdfs/h-gea/gg-2002/gg021-2d.pdf>).
- Mordes, J., Bortell, R., Blankenhorn, E., Rossini, A., Greiner, D. (2004). Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR Journal*, 45 (3): 278-91. doi: 10.1093/ilar.45.3.278.
- Nagy, C. y Einwallner, E. (2018). Study of in vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). *Journal of Visualized Experiments*, 131: 1-12. doi: 10.3791/56672.
- Nanjan, M. J., Mohammed, M., Kumar, P., Chandrasekar, M. J. N. (2018). Bioorganic chemistry thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorganic Chemistry*, 77 (2): 548-567. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.02.009.
- Newsholme, P., Fernandes, V., Keane, K., Carlessi, R., Ivo, P. B. H. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*, 473 (24): 4527-4550. doi: 10.1042/BCJ20160503C.
- Phillips, M., Liu, Q., Hammond, H., Dugan, V., Hey, P., Caskey, C. T., Hess, F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetics*, 13 (1): 18-19. doi: 10.1038/ng0596-18.
- Plum, L., Wunderlich, F. T., Baudler, S., Krone, W., Brüning, J. C. (2005). Transgenic and knockout mice in diabetes research: Novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology (Bethesda)*, 20: 152-161. doi: 10.1152/physiol.00049.2004.
- Polonsky, K. (2012). The past 200 years in diabetes. *New England Journal of Medicine*, 367 (14): 1332-1340. doi:10.1056/NEJMra1110560.
- Rincón-Sánchez, A. R., Islas-Carbajal, M. C. (2016). *Biología Molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Capítulo 24: Bases moleculares de la diabetes mellitus tipo 2. Segunda edición, McGraw-Hill.
- Rozman, J., Rathkolb, B., Neschen, S., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Klingenspor, M., Wolf, E., Hrabe, M. (2015). Glucose tolerance tests for systematic screening of glucose homeostasis in mice. *Current Protocols in Mouse Biology* 5 (1): 65-84. doi: 10.1002/9780470942390.mo140111.

Sell, H. y Eckel, J. (2009). Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: in vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation? *Proc. Nutr. Soc.* 68 (4): 378-384. doi: 10.1017/S0029665109990218.

Sharabi, Y. (2012). Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (Diabetesotension). *Diabetes Metabolism Research and Review*, 2012: 1-10. doi: 10.1002/dmrr.2371.

Sharma, K., McCue, P., Dunn, S. (2003). Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 284 (6): F1138-1144. doi: 10.1152/ajprenal.00315.2002.

Shirwaikar, A., Rajendran, K., Dinesh-Kumar, C., Bodla, R. (2004). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 91 (1): 171-175. doi: 10.1016/j.jep.2003.12.017.

Song, R. (2017). Mechanism of metformin: A tale of two sites. *Diabetes Care*, 39 (2): 187-189. doi: 10.2337/dci15-0013.

Srinivasan, K. y Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research*, 125 (3): 451-472. (<https://www.ijmr.org.in/article.asp?issn=0971-5916;year=2007;volume=125;issue=3;spage=451;epage=472;aulast=Srinivasan;type=0>).

Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 237 (5): 481-490. doi: 10.1258/ebm.2012.011372.

Tanti, J. F., Cormont, M., Gremeaux, T., Marchand-Brustel, Y. (2001). Assays of glucose entry, glucose transporter amount, and translocation. *Methods in Molecular Biology*, 155: 157-165. doi: 10.1385/1-59259-231-7:157.

Timothy, D., Wenya, Y., Pragna, H., Bo, P., Massoudi, M., Wintefeld, N., Semilla, A., Franz, J., Hogan, (2014). The economic burden of elevated blood glucose levels in 2012: Diagnosed and undiagnosed diabetes, gestational Diabetes Mellitus, and prediabetes. *Diabetes Care*, 37 (12): 3172-3179. doi: 10.2337/dc14-1036.

Ugwoke, C. K., Urban, S., Nakayama, A., Umek, N. (2017). Sulfonylureas in type 2 Diabetes Mellitus: Current evidence, conflicts and clinical implica-

tions. *Nigerian Journal of Medicine*, 20 (1): 68-75. (<https://www.ajol.info/index.php/njm/article/view/158975>).

Van Baar, M. J. B., Van Ruiten, C. C., Muskiet, M. H. A., Van Bloemendaal L., I. J., Zerman, R. G., Van Raalte, D. H. (2018). SGLT2 inhibitors in combination therapy: from mechanisms to clinical considerations in type 2 diabetes management. *Diabetes Care*, 41 (8): 1543-1556. doi: 10.2337/dc18-0588.

Xuguang, H., Aofei, T., Tao, L., Longyang, Z., Weijian, B., Jiao, G. (2019). Hesperidin ameliorates insulin resistance by regulating the IRS1-GLUT2 pathway via TLR4 in HepG2 cells. *Phytotherapy Research*, 33 (6): 1697-1705. doi: org/10.1002/ptr.6358.

Zakaria, E., El-Maraghy, N., Ahmed, F. A., Abdelmonim, A., El-Bassossy, H. (2017). PARP inhibition ameliorates nephropathy in an animal model of type 2 diabetes: Focus on oxidative stress, inflammation, and fibrosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390: 621-631. doi: 10.1007/s00210-017-1360-9.

Zimmet, P., Alberti, K. G., Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414 (6865): 782-787. doi: 10.1038/414782a.

Ziv, E., Shafir, E., Kalman, R., Galer, S., Bar-On, H. (1999). Changing pattern of prevalence of insulin resistance in *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced type 2 diabetes. *Metabolism*, 48 (12): 1549-1554. doi: 10.1016/s0026-0495(99)90244-5.

Capítulo 7.

Modelos de evaluación preclínica de compuestos con posible actividad antiasmática

Angélica Flores Flores*

Amanda Sánchez Recillas**

* Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

** Ammar-Te Sano Cosmética Natural Científica.

Las enfermedades respiratorias son complejas de tratar debido a los diferentes mecanismos inmunológicos, farmacológicos y ambientales que las afectan. El asma es una de las enfermedades crónicas no transmisibles que afecta a niños y adultos en todo el mundo y, de acuerdo con la European Respiratory Society, se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en la cual diferentes mediadores celulares de la inflamación participan, además de estar condicionada por algunos factores genéticos, el estrechamiento de las vías respiratorias ante estímulos físicos o químicos y factores ambientales como alérgenos, infecciones respiratorias, ejercicio y estilo de vida. Este padecimiento se reporta como una de las enfermedades crónicas más comunes en los niños que deteriora su calidad de vida (GINA, 2022).

El principal motivo de consulta hospitalaria de pacientes asmáticos se atribuye a los síntomas que el 90 % de los pacientes presentan. En términos clínicos se manifiesta con tos, dificultad respiratoria, aumento en la frecuencia respiratoria, respiración sonora como silbidos (sibilancias), hundimiento de los músculos intercostales para ayudar a respirar (tiraje) y sensación de ahogo. No obstante, esto no es suficiente para su diagnóstico, porque síntomas similares pueden ser presentados en otras enfermedades respiratorias; algunos de los factores que pueden incrementar la presencia de síntomas son: el ejercicio, exposición a alérgenos, infecciones virales y emociones (Forno et al., 2015; SENCT, 2020).

El asma se caracteriza por diferentes observaciones fenotípicas que refieren a la descripción clínica, síntomas, desencadenantes y características alérgicas causadas por diferentes vías (endotipos). De acuerdo con los fenotipos, puede ser clasificada como asma de fase temprana (asma alérgica); asma de fase tardía (eosinofílica); aquella inducida por ejercicio o relacionada con la obesidad, y el asma paucigranulocítica (Palange y Simonds, 2001: 264-273). Los endotipos pueden ser abordados como tipo 2 (T2) alto y T2-bajo, de acuerdo con la inflamación presentada. En la actualidad se buscan terapias que exploren los diferentes mecanismos a nivel inmunológico y farmacológico, debido a la complejidad y heterogeneidad del asma (Merin et al., 2019).

7.1 Mecanismos inmunológicos del asma alérgica

El término “alergia” fue acuñado por Clemens von Pirquet, en 1906, para distinguir a individuos que desarrollan signos y síntomas de reactividad o reacciones de hipersensibilidad cuando se exponen a ciertas sustancias (Galli et al., 2008). Los desórdenes alérgicos suelen asociarse a la producción de IgE específica de alérgenos y expansión de poblaciones de células T específicas de alérgenos. La IgE es producida tanto por las células plasmáticas en los ganglios linfáticos, que drenan el sitio de entrada del antígeno, como por las células plasmáticas en el sitio de la reacción alérgica, donde los centros germinativos se desarrollan dentro del tejido inflamado.

Antes de examinar los mecanismos inmunológicos es importante aclarar qué son los alérgenos: existen dos tipos principales de ellos. El primero involucra cualquier medio ambiental no infeccioso que puede inducir a la producción de IgE, y la reexposición posterior a esa sustancia induce una reacción. Los alérgenos comunes derivan de pólenes de hierba, árboles, ácaros, partículas fecales, ciertos alimentos, látex, algunos medicamentos y venenos de insectos. El segundo tiene que ver con un agente o sustancia ambiental infecciosa, que puede inducir una respuesta inmune adaptativa asociada con inflamación local, pero se cree que ocurre independientemente de IgE.

En el asma alérgica existe un proceso de inflamación y se clasifica en dos fases: reacciones de fase temprana y reacciones de fase tardía (Galli et al., 2008).

7.1.1 Sensibilización a un alérgeno

Al desarrollar una respuesta alérgica lo que ocurre primero es un proceso de sensibilización a un alérgeno en particular; las células dendríticas (CDs) son las células presentadoras de antígeno (CPA) más potentes, y se encuentran justo debajo de la capa epitelial de las vías respiratorias, el antígeno capturado endocíticamente por las CDs es continuo a la migración de las células a los ganglios mediastínicos, donde los antígenos son procesados a péptidos para la presentación al complejo de histocompatibilidad principal clase II (MHCII) (Figura 1). Así, cuando un sujeto es previamente sensibilizado a un alérgeno en particular, la expresión de los receptores de alta afinidad (FcεRI) para IgE sobre las células dendríticas, facilita el proceso del alérgeno específico

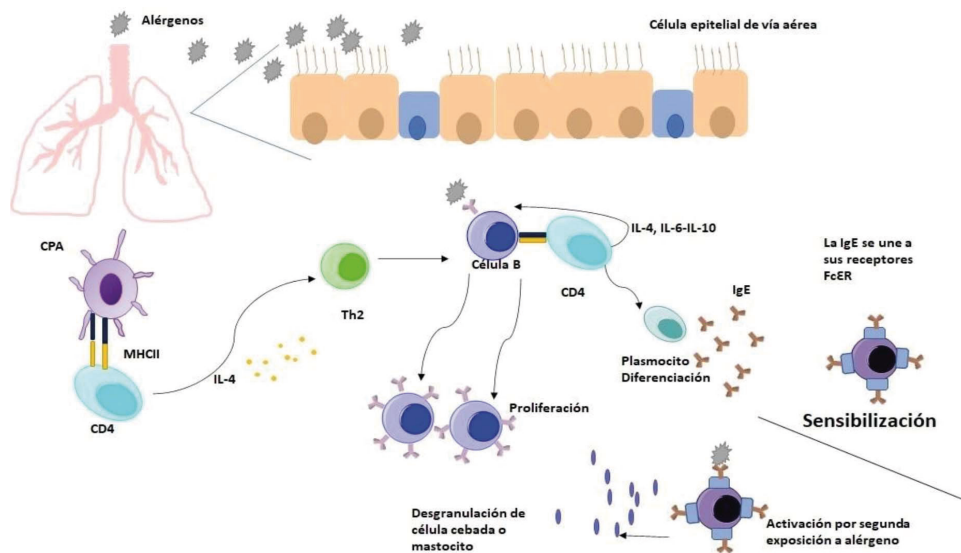


Figura 1. Proceso de sensibilización al alérgeno de las vías respiratorias. CPA (célula presentadora de antígeno); FcεRI (receptor de IgE de alta afinidad); MHCII (molécula de histocompatibilidad, clase II); TCR (receptor de célula T).

capturado por la unión de IgE. Las células T Naive CD4⁺, la expresión del complejo de receptor TCR/CD3, se unen a las proteínas MHCII y en conjunto a las moléculas estimuladoras CD28 y CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) sobre las células T CD4⁺, originando una respuesta Th1, Th2, Th9, Th17 o Treg, dependiendo de las señales de las citocinas liberadas (Figura 1) (Galli et al., 2008; Mullane, 2011).

Fase temprana

Las reacciones de fase temprana ocurren minutos después de ser expuesto un individuo a un alérgeno, y se reflejan con la secreción de mediadores que son liberados de las células dendríticas y la reacción puede ser localizada o sistémica (Galli et al., 2008). Cuando se cruzan las moléculas adyacentes de IgE por alérgenos bivalentes o multivalentes, la unión a FcεRI activa un complejo proceso de señalización secretando productos activos como los gránulos citoplasmáticos, mediadores derivados de lípidos y citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, entre otros productos (Galli et al., 2008; Passalacqua y Ciprandi, 2008).

Por otra parte, dentro de las citocinas que participan, la IL-5 e IL-9 son responsables de la hiperplasia de las células cebadas y la eosinofilia. A su vez, la IL-13 regula la proliferación de células seguida por la inducción a la producción de moco y mucina, los cuales son marcadores importantes en el asma alérgica (Kubo, 2017). La liberación de todos los mediadores antes mencionados contribuye a los signos y síntomas agudos asociados con las reacciones de fase temprana, las cuales cambian de acuerdo con el sitio de reacción e incluyen vasodilatación, permeabilidad vascular incrementada, contracción del músculo liso bronquial y un incremento en la secreción de moco, así como los nervios sensoriales y nociceptores que inducen la tos, hinchazón y estornudos (Galli et al., 2008; Weersink et al., 1994).

Fase tardía

Las reacciones de fase tardía suceden después de dos a seis horas de exposición al alérgeno y se caracterizan por la hipersecreción de moco. Asimismo, inician esta reacción las células cebadas residentes activadas por IgE y alérgenos, o las células T que suelen reconocer péptidos derivados de alérgenos. Las reacciones de fase tardía son consecuencia de la liberación de mediadores por las células cebadas, durante las reacciones de fase temprana (Galli et al., 2008; Kubo, 2017; Weersink et al., 1994).

7.2 Mecanismo de contracción del músculo liso bronquial

La contracción en el músculo liso de la vía aérea (MLVA) es un proceso que ocurre como respuesta a la reacción alérgica, este mecanismo es regulado por la innervación parasimpática y la liberación de agonistas contráctiles, los cuales actúan sobre receptores específicos localizados en la membrana celular. Así, la estimulación de los receptores induce la liberación intracelular de segundos mensajeros procontráctiles, y éstos ocasionan un aumento en la concentración intracelular del ión calcio (Ca^{2+}), ya sea favoreciendo la entrada de dicho ión desde el espacio extracelular, o induciendo a la liberación del mismo desde el retículo sarcoplásmico (RS), que es el sitio donde se almacena el calcio dentro de la célula. El influjo de Ca^{2+} puede ser ocasionado por la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), en particular, canales de calcio tipo L (CCDV-L). La apertura de éstos se basa en

la magnitud de la despolarización de la membrana, mecanismo en el cual los canales de potasio (K^+) participan activamente.

Así, la apertura de canales de K^+ permite la salida de este ión, con lo cual se estabiliza el potencial de membrana de las células del MLVA. Por otra parte, el bloqueo de los canales de K^+ despolariza la membrana y, por tanto, la apertura de los CCDV-L; a mayor despolarización más Ca^{2+} entrará a la célula y más fuerte será la contracción del músculo liso, aunque la despolarización puede estar dada también por canales de Ca^{2+} dependientes de canales de cloro (Cl^-), y por la entrada de sodio Na^+ por canales catiónicos. Además, en la membrana plasmática se encuentran otros canales de Ca^{2+} que no están controlados por voltaje, como los canales de Ca^{2+} operados por receptor (CCOR), los cuales son activados por agonistas y actúan principalmente sobre una gama de receptores acoplados a proteínas G; también se encuentran los canales de Ca^{2+} operados por depósito (CCOD), que son activados tras el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} dentro del RS (Ouderago y Roux, 2014; Fox, 2013; McFadzean y Gibson, 2002; Hall, 2000).

Para la liberación de Ca^{2+} desde el RS, es necesario que un agonista como la acetilcolina (ACh) o la histamina estimulen la señalización, mediante la unión a un receptor acoplado a proteína G (RAPG), al receptor de muscarínico ACh (M_3mAChR) y/o al receptor de histamina H_1 (H_1hR), respectivamente. Al ser estimulados estos receptores, activan a su proteína Gq, la cual sufre un cambio conformacional y se disocian las subunidades beta (β)/ gamma (γ) de alfa (α), ocasionando la activación de alfa (α); y con ello la estimulación de la actividad de la fosfolipasa C (PLC), enzima específica que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) (un fosfolípido presente en la membrana celular), obteniéndose dos segundos mensajeros: inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG).

La unión de IP_3 a sus receptores (IP_3R) presentes en el retículo sarcoplásmico, da como resultado la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma celular; el IP_3 también puede unirse a los receptores de rianodina (RyR) presentes en la membrana del RS, lo que provoca una amplificación en la liberación de calcio. Por otro lado, el DAG junto con Ca^{2+} activan a la proteína cinasa C (PKC), encargada de fosforilar proteínas, dependiendo de la isoenzima de PKC en el

músculo liso, ya que cada una tiene un papel específico en el tejido (Ouderao y Roux, 2014; Hall, 2000; Billington y Penn, 2003; Webb, 2003).

El Ca^{2+} liberado dentro de la célula se une a la calmodulina en el citoplasma celular, formando un complejo llamado calcio-calmodulina; el complejo activa la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), y esta enzima cataliza la fosforilación de cadenas ligeras de miosina (MLC), un componente de los puentes de miosina. En el músculo liso, la fosforilación de puentes de miosina permite unirse a la actina formando diversos puentes cruzados, acortando las fibras del miocito; como resultado se produce una contracción, mecanismo que se esquematiza en la Figura 2 (Ouderao y Roux, 2014; Hall, 2000; Billington y Penn, 2003; Webb, 2003).

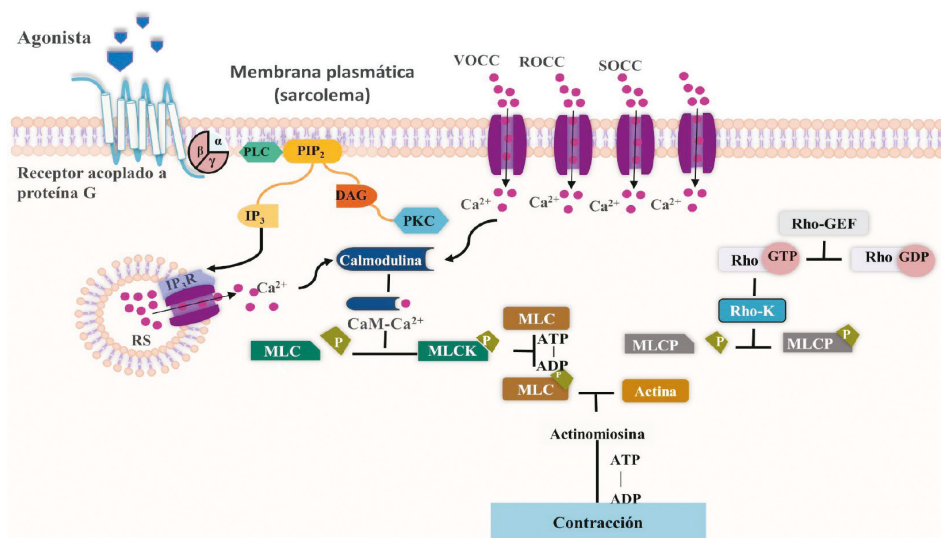


Figura 2. Mecanismo de contracción del músculo liso. VOCC: canal de Ca^{2+} operado por voltaje; ROCC: canal de calcio operado por receptor; SOCC: canal de calcio operado por depósito; KC: canal de potasio; Kv: canal de potasio regulado por voltaje; BKCa: canal de potasio activado por calcio; KATP: canal de potasio activado por ATP; Ca^{2+} : calcio; K^{+} : potasio; PLC: fosfolipasa C; PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; RS: retículo sarcoplásmico; IP₃R: receptor de inositol trifosfato; PKC: proteína cinasa C; CaM: calmodulina; P: fosfato; MLCK: cinasa de la cadena ligera de miosina; MLC: cadena ligera de miosina; ATP: trifosfato de adenosina; ADP: difosfato de adenosina; MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de miosina; Rho-K: cinasa de Rho; GTP: trifosfato de guanina; GDP: difosfato de guanina; Rho-GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Adaptado de Webb, 2003; Hall, 2000; Gómez y Piskorz, 2013).

La elevación en la concentración de Ca^{2+} dentro de la célula no es permanente, por lo que la respuesta contráctil se mantiene mediante un mecanismo de sensibilización de Ca^{2+} , provocado por la inhibición de la actividad de la fosfatasa de miosina (MLCP) por medio de Rho cinasa (Rho-K), que desfosforila a MLCP inhibiendo con ello su actividad. Este mecanismo de sensibilización de Ca^{2+} se inicia al mismo tiempo que se activa la PLC, e implica la activación de la proteína Rho de unión a GTP. La activación de Rho dada por el receptor acoplado a la proteína G no está clara, pero implica la migración de Rho a la membrana plasmática. Tras la activación, Rho aumenta la actividad Rho-K, lo que lleva a la inhibición de la fosfatasa de miosina favoreciendo al estado contráctil (Webb, 2003).

7.3 Terapias actuales en el tratamiento del asma

Para el diagnóstico de este padecimiento se evalúan los signos y síntomas, la función pulmonar y la hiperreactividad bronquial (GINA, 2022; SENCT, 2020). Así, dependiendo del nivel de control y fenotipo de asma, se establece el tratamiento farmacológico. De acuerdo con la última actualización del 2022 de la guía para el manejo del asma —emitida por la Global Initiative for Asthma (GINA)—, el tratamiento de esta enfermedad debe ajustarse al paciente de forma individual y teniendo como objetivo mejorar la función pulmonar, además de tomar en consideración su nivel de control de síntomas diurnos y nocturnos. Por otro lado, se busca reducir el número de exacerbaciones, el uso de medicamentos de rescate, las visitas a urgencias, así como los eventos asociados a la efectividad de los medicamentos disponibles, su seguridad y su costo (GINA, 2022).

La falta de cumplimiento de las indicaciones terapéuticas para el asma es un factor importante en el descontrol de la enfermedad, y puede traer como consecuencia el agravamiento de los síntomas, pérdidas económicas para el paciente y el incremento de los gastos de los servicios de salud, así como un posible deterioro de la calidad de vida del paciente y su familia. Actualmente dos tipos de fármacos son utilizados en el tratamiento de la obstrucción de vías aéreas: los *broncodilatadores*, que inmediatamente revierten la obstrucción de vías aéreas por la relajación del músculo liso; y los *controladores* o *antiinflamatorios* que tienen una respuesta a largo plazo,

mediante la inhibición de la infiltración y activación de células inflamatorias, así como de su síntesis o liberación de mediadores inflamatorios (Barnes, 2006). También existe una terapia acumulada, usada cuando los síntomas del paciente son persistentes y con exacerbaciones recurrentes, por lo que se prescriben altas dosis de medicamentos controladores y agonistas β_2 -adrenérgicos (Flórez et al., 2014; Katzung et al., 2012: 339-356).

- a. **Farmacoterapia a corto plazo:** Son los fármacos utilizados en el tratamiento de las crisis agudas y para la prevención del asma inducida por el ejercicio, se incluyen los β_2 -adrenérgicos de acción corta, anticolinérgicos y corticoides sistémicos.
- b. **Farmacoterapia a largo plazo:** Se utilizan como tratamiento preventivo a largo plazo, se incluyen los corticoides inhalados y sistémicos, cromonas, β_2 -adrenérgicos de larga duración inhalados, metilxantinas, anti-leucotrienos y anticuerpos monoclonales (GINA, 2022; Barnes, 2006; Flórez et al., 2014; Katzung et al., 2012: 339-356).

Las terapias convencionales en los pacientes con asma hacen uso exagerado de los corticosteroides orales, pero se tiene como objetivo principal disminuir la intervención con ellos, por la cantidad de efectos adversos que éstos representan y que ocasionan fallas en el plan de tratamiento. Y aunque se tienen terapias como el uso de biológicos (anti-IL-4R α , anti-IgE, anti-IL5 y anti-IL5R α), los corticosteroides se recomiendan en casos específicos durante el tratamiento (GINA, 2022).

7.4 Modelos farmacológicos para la evaluación de fármacos antiasmáticos

Numerosos grupos de investigación se han enfocado en la búsqueda de nuevas entidades químicas que contribuyan positivamente en la fisiopatología del asma. Estos investigadores coinciden en que un modelo de bioevaluación “ideal” debe considerar tres aspectos característicos de la enfermedad: obstrucción bronquial reversible, inflamación e hiperreactividad bronquial. Así, es necesario implementar modelos experimentales de asma que permitan evaluar moléculas bioactivas novedosas y extractos naturales, desde un enfoque celular, tisular y fisiológico (Bates et al., 2009; Holmes et al., 2011; Mullane y Williams, 2013).

Los modelos experimentales de evaluación antiasmática se pueden clasificar en *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, siendo los modelos *in vitro* y *ex vivo* útiles para la evaluación antiinflamatoria y broncodilatadora respectivamente; mientras que los modelos *in vivo* son los que proporcionan mayor información, ya que se puede reproducir la patología en sus dos procesos fisiopatológicos, la inflamación y la subsecuente broncoconstricción.

7.4.1 Modelos con roedores que semejan la bronco-constricción (modelo *ex vivo*)

Los modelos *ex vivo* son modelos experimentales que se realizan en tejidos aislados de roedores, los cuales son mantenidos en condiciones fisiológicas durante todo el experimento. Estos bioensayos se fundamentan en el conocimiento de los mecanismos funcionales y celulares de tejidos que contienen músculo liso, ya que en estos modelos se determinan los cambios en la tensión (contracción) en tráquea y bronquios. Los animales de experimentación que se utilizan en este tipo de bioensayos incluyen ratón, rata y cobayo, siendo este último el más recomendado, ya que posee la mayor similitud con el tejido humano.

Sin embargo, la rata es el roedor más utilizado, ya que es fácil de manipular, es asequible y están ampliamente descritos los mecanismos fisiológicos de contracción-relajación de sus vías aéreas. Las ventajas del modelo *ex vivo* es que proporciona información del efecto broncodilatador y el mecanismo de acción de una sustancia, aportan evidencia de los potenciales *targets*, y es posible obtener datos de potencia y/o eficacia de una sustancia. En cuanto a las limitaciones de este modelo, se encuentran que requiere equipo científico especializado y personal capacitado para llevarlo a cabo, y para analizar los resultados obtenidos, además no aporta evidencia del potencial antiinflamatorio de las sustancias a evaluar, ni de la capacidad de éstas para alcanzar un *target* específico.

En el modelo de evaluación traqueo-relajante generalmente se utilizan ratas macho adultas de estirpe Wistar o Sprague-Dawley sanas. Para obtener el tejido, posterior a la anestesia, se realiza un corte a nivel del cuello y se extrae la tráquea. Este tejido es colocado dentro una solución fisiológica en todo momento (solución de Ringer Krebs), posteriormente es liberado de tejido

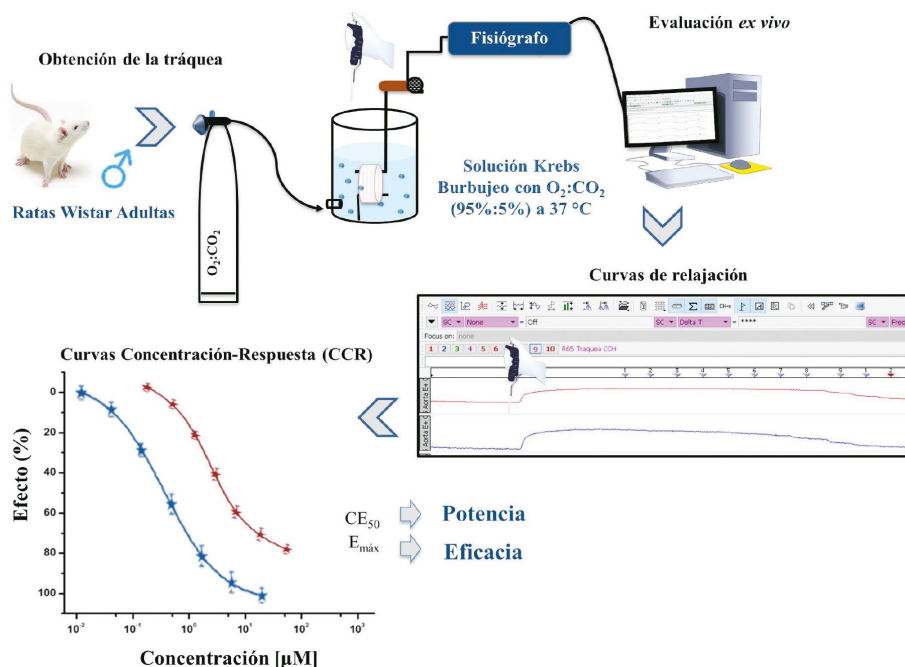


Figura 3. Diagrama experimental del bioensayo ex vivo en anillos de tráquea aislados de rata.

conectivo y adyacente y es disectado en anillos de 2-3 mm de longitud. Los anillos de tráquea son colocados en cámaras de incubación de un fisiógrafo para órgano aislado marca BIOPAC®, en el cual se mantiene el tejido en condiciones fisiológicas de pH, temperatura y solución fisiológica, este proceso se muestra en la Figura 3.

El equipo mide los cambios en la tensión del tejido, en presencia de agonistas contráctiles y dilatadores. El tejido es sometido a una contracción con carbacol (un análogo de acetilcolina) [$1\mu M$], contracción que es considerada como el 100 % del efecto, entonces se mide la disminución de la contracción tras la adición de sustancias de prueba (compuestos naturales o sintéticos, extractos vegetales y/o fracciones primarias), que se adicionan en concentraciones logarítmicas y en orden acumulativo. Se utilizan fármacos broncorrelajantes de referencia como la teofilina (un inhibidor de fosfodiesterasas).

El efecto de las muestras de prueba es calculado mediante la resta del valor de la contracción antes y después de añadir las muestras de prueba. Con los datos normalizados se obtienen curvas concentración-respuesta (CCR) del efecto relajante, y parámetros farmacológicos de Eficacia ($E_{\text{máx}}$) y Potencia (CE_{50}) (Sánchez et al., 2019).

La imagen resume el modelo experimental, en el cual se utilizan ratas de cepa Wistar, a las cuales se les disecta la tráquea, el tejido es colocado dentro de una cámara de incubación con 10 mL de solución fisiológica de Krebs y se mantiene en condiciones fisiológicas de pH, temperatura y constante oxigenación con O_2 : CO_2 (95:5 %). El tejido es conectado a un transductor de fuerza que envía las señales detectadas en el tejido a un sistema de registro BIOPAC®, y éste las muestra en la pantalla de una computadora; finalmente los datos son analizados y utilizados para realizar curvas concentración-respuesta (CCR) y obtener parámetros farmacológicos.

7.4.1.1 Determinación de mecanismo de acción en el modelo *ex vivo*

Adicionalmente, empleando la metodología antes mencionada, es posible obtener información sobre el o los posibles targets de las sustancias evaluadas. Para esto, el tejido es disectado y sometido a un proceso de sensibilización en condiciones *ex vivo* (mencionadas previamente), posterior a ello, se incuban fármacos conocidos que inhiben o bloquean targets involucrados con el mecanismo fisiológico de contracción y relajación del músculo liso de la vía aérea; enseguida se determina el efecto relajante de las sustancias de prueba y el control en la tráquea tratada con los fármacos (Bates et al., 2009; Sánchez-Recillas et al., 2014a,b).

Mediante la curva de concentración respuesta (CCR), se compara la modificación del efecto farmacológico en presencia y ausencia de los fármacos o compuesto bioactivo. En la Tabla 1 se mencionan los fármacos empleados en estos experimentos, y los efectos que producen en el experimento *ex vivo*.

7.4.2 Modelos con roedores que semejan el proceso asmático

Los modelos de asma en roedores brindan información relevante que provee un mejor entendimiento de la enfermedad, y facilitan el desarrollo preclínico de fármacos que son requeridos con urgencia en la clínica, para el

Tabla 1. Objetivos de blancos moleculares en la búsqueda del mecanismo de acción.*

Objetivo del experimento	Fármacos	Mecanismo	Efecto esperado
Identificar la participación directa de receptores β 2-adrenérgicos y/o de AMPc	Salbutamol / Isoproterenol	Agonistas β -adrenérgicos incrementan el AMPc	La CCR se potencia
Identificar la participación indirecta de segundos mensajeros cíclicos	Teofilina	Inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas, incrementa el AMPc y GMPc	La CCR disminuye su potencia
Identificar la participación de la vía NO-GMPc	ODQ	Inhibidor de la guanilato ciclasa, disminuye el GMPc	La CCR disminuye su eficacia y/o potencia
	L-NAME	Inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa epitelial, y de la guanilato ciclasa soluble (GCs), disminuyen el óxido nítrico (NO) y/o GMPc	La CCR disminuye su eficacia y/o potencia
Identificar la participación directa de adenilato ciclasa y/o AMPc	SQ 22536	Inhibidor de la Adenilato ciclasa, disminuye el AMPc	La CCR disminuye su eficacia y/o potencia
Identificar la participación de canales de calcio	Cloruro de calcio (CaCl_2)	Agonista de los canales de calcio, del miocito, incrementa el calcio intracelular	El efecto contráctil producido se ve modificado por sustancias bloqueadoras de canales de calcio
Identificar la participación de canales de potasio	Glibenclamida	Bloqueador de canales de potasio sensibles a ATP, disminuye el flujo de potasio	Disminuye el flujo de potasio y las CCR disminuyen su eficacia y/o potencia
	2-Aminopiridina	Bloqueador de canales de potasio dependiente de voltaje, disminuye el flujo de potasio	Disminuye el flujo de potasio y las CCR disminuyen su eficacia y/o potencia

* Fuentes: Sánchez -Recillas et al., 2014c, 2019; López et al., 2017; Flores et al., 2019; Arias et al., 2020.

tratamiento de enfermedades respiratorias. Entre los criterios más importantes para el uso de modelos animales íntegros, en la investigación sobre la fisiopatología del asma, se encuentra que el modelo es de relevancia para la reacción específica que se aborda, al presentar las características más comunes que un paciente puede mostrar (Vargas et al., 2010).

7.4.2.1 Modelo de asma alérgica en ratones

Los modelos de ratón de asma alérgica han sido utilizados a lo largo de los años, para observar respuestas en el manejo de la inflamación pulmonar, hiperrespuesta de vías aéreas y obstrucción, observando el rol de las células T cooperadores tipo 2 (Th2). Existen diferentes modelos que consisten en la sensibilización de los animales con ovoalbúmina o con ácaros de polvo doméstico; estos modelos simulan características del asma humano, en el cual se presentan inflamación eosinofílica e hiperreactividad de las vías aéreas, una sobreproducción de citocinas Th2 en los pulmones y un incremento en suero de inmunoglobulina E (IgE) (Shin et al., 2009).

Durante las últimas décadas, el desarrollo de cepas de ratones modificadas genéticamente ha introducido oportunidades sin precedentes, para definir mecanismos y vías mediante la sobreexpresión o eliminación de proteínas que median o regulan una variedad de procesos. Además, en los modelos de ratones para estudiar las respuestas funcionales de los pulmones, el músculo liso de las vías respiratorias del ratón tiene limitaciones al no responder a algunos agonistas importantes, como la histamina y los cisteinil-leucotrienos; ni mostrar broncoconstricción inducida por antígenos. Hay una serie de descubrimientos en tales estudios que han sido importantes para la comprensión, en particular, del sistema inmunológico, aproximando el modelo al padecimiento de esta enfermedad en humanos (Blume y Davies, 2013; Vargas et al., 2010).

7.4.2.2 Asma alérgica en cobayo por pletismografía con respiración espontánea

El modelo de asma alérgica en cobayos comparte varias semejanzas con los humanos, en anatomía, farmacología y fisiología pulmonar; y a diferencia de los ratones, presentan una reacción alérgica fuerte a la histamina y leucotrienos liberados por las células cebadas para inducir la broncoconstricción. Asimismo, al activarse las células cebadas, se liberan otros mediadores

celulares como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, que contribuyen en la respuesta inmune de las vías respiratorias (Bazán *et al.*, 2004; Vargas, 2009).

El modelo de asma inducida con ovoalbúmina en cobayo es muy utilizado para la evaluación de moléculas bioactivas para tratamientos de asma, y consiste en un proceso de sensibilización, reforzamiento y retos antigénicos mediante la pletismografía barométrica; con este método se mide de forma indirecta la función respiratoria en animales con libre movimiento (Figura 5a). Es un modelo no invasivo y consiste en introducir al animal a una cámara con una circulación constante de flujo de aire que no altera la señal de respiración. Una vez que el animal se encuentra dentro de la cámara y está estable, el equipo comienza a medir diferentes parámetros relativos a los cambios de la presión inducida por la respiración dentro de la cámara. Uno de los valores más importantes es el *Penh* o pausa, es un índice sin unidades con cierto significado fisiológico, con el que se muestra una correlación con la resistencia pulmonar de los animales (Figura 5b).

En el proceso de sensibilización, considerado como el día 1, se administra una solución de ovoalbúmina con hidróxido de aluminio como adyuvante, vía intraperitoneal y subdérmica, mientras que a un grupo control se le administra solo con solución salina fisiológica (SSF) y se realiza la misma manipulación. Para el día 8, en el refuerzo antigénico, los cobayos se colocan por separado dentro de una cámara de pletismografía provista de flujo de aire (10 ml/s), y es nebulizada una solución de ovoalbúmina durante cinco minutos, evaluando la función pulmonar mediante pletismografía barométrica cinco minutos antes y durante una hora posterior al refuerzo.

Finalmente, los días 15, 25 y 35, se evalúan tres retos con el antígeno, generando un modelo subagudo de asma alérgica, en el cual pueden evaluarse para el grupo de prueba del fármaco experimental, el efecto que tienen respecto a la respuesta inducida, midiendo inicialmente el índice de bronco-obstrucción (íB) basal; posteriormente se nebulizan dosis no acumulativas de histamina (desde 0.01 hasta 0.32 mg/ml) durante un minuto. Para cada dosis se registra el íB durante cinco minutos continuos y se obtiene el valor promedio del intervalo entre cada dosis de 10 minutos aproximadamente.



Figura 4. Protocolo experimental del modelo de asma aguda alérgica en cobayo.

La curva dosis-respuesta se termina una vez que la histamina produce una bronco-obstrucción que triplique el $\dot{V}_B$ basal, a lo cual se le conoce como dosis provocativa 200 (DP_{200}). Posteriormente, se espera a que la bronco-obstrucción disminuya a un $\dot{V}_B$ aproximado al 50 % del valor basal, y se reta durante otro minuto con aerosoles de ovoalbúmina. La segunda curva de histamina se realiza tres horas después del reto con ovoalbúmina, siguiendo el mismo protocolo de la primera curva antes mencionado. A los cobayos control se les administra solución fisiológica en lugar de ovoalbúmina (Flores et al., 2019; Vargas, 2009) (Figura 4).

Finalmente, cuando los animales de los diferentes grupos regresan a sus niveles basales del índice de broncoobstrucción, se procede a la eutanasia de los mismos, y se aíslan muestras biológicas, como los pulmones, sangre y lavados bronquioalveolares, para la evaluación de las muestras con análisis de histología, ensayos de inmunohistoquímica y Elisás, dependiendo del objetivo del estudio y tipos de mediadores inflamatorios de interés; esto se puede hacer a las 24 horas del estudio o de forma inmediata a la extracción de las diferentes muestras (Figura 5a-e).

Se muestra el esquema de sensibilización, refuerzo antigénico y el uso de la pletismografía barométrica para la evaluación del índice de broncoconstricción ($\dot{V}_B$).

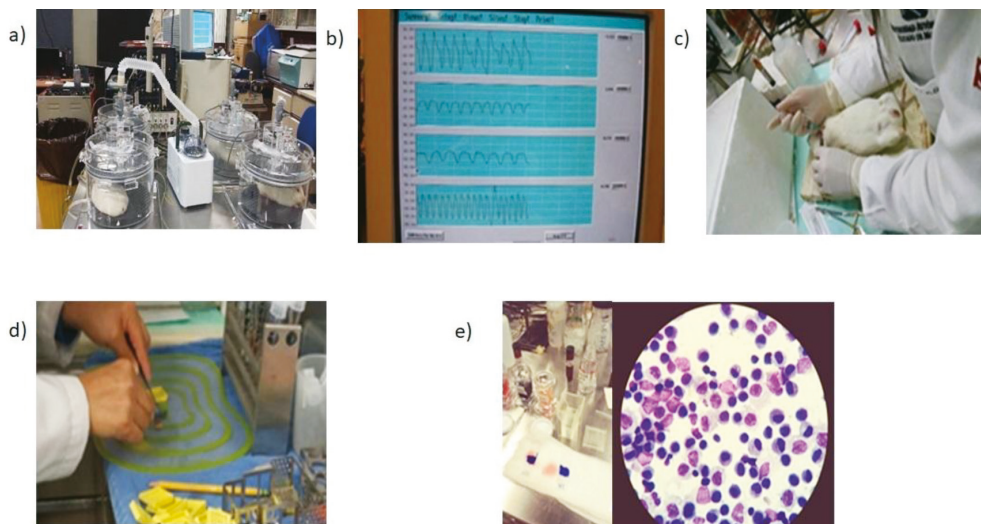


Figura 5. Modelo de asma alérgica en cobayo: a) Equipo de pletismografía barométrica; b) Registro de valores PENH durante el ensayo; c) Extracción de lavados bronquioalveolares de animales por grupo; d) Cortes histológicos de pulmón para tinciones; e) Tinciones (Romanowsky) y observación en microscopio de lavados bronquioalveolares.

7.5 Evaluación farmacológica antiasmática en la búsqueda de nuevos fármacos

En la Tabla 2 se enlistan resultados experimentales realizados por algunos grupos de investigación y las autoras de este capítulo, en los cuales se emplean los modelos experimentales antes mencionados.

Tabla 2. Modelos de evaluación farmacológica empleados en la búsqueda de fármacos antiasmáticos.

Muestra evaluada	Principales hallazgos	Referencias
Evaluación tráqueo-relajante empleando el modelo de anillos de tráquea precontraída con carbacol 1μM		
Extracto diclorometánico de la especie vegetal <i>Artemisia ludoviciana</i>	El extracto mostró efecto relajante significativo, mediante posible antagonismo de receptores muscarínicos y bloqueo de canales de calcio	Estrada-Soto et al., 2012.
• Extracto hexánico y diclorometano de la especie vegetal <i>Agastache mexicana</i> • Extracto diclorometano de la especie vegetal <i>Cochlospermum vitifolium</i> • Extracto hexánico de la especie vegetal <i>Lepechinia caulescens</i> • Extracto diclorometano de la especie vegetal <i>Talauma mexicana</i>	Los extractos mostraron efecto relajante significativo ($E_{\text{máx}} > 80\%$) en anillos de tráquea aislados de rata	Sánchez-Recillas et al., 2014a,b.
Se evaluó el compuesto 4-metil-7-etoxicumarina, un derivado sintético de cumarinas	El compuesto mostró efecto relajante significativo, a través del bloqueo de canales de calcio y posible incremento de AMPc	Sánchez-Recillas et al., 2014a,b.
Se evaluaron 18 derivados sintéticos de 6,7-dihidroxycumarina	Los compuestos 6,7-dimetoxicumarina, 7-propoxicumarina y 7-etoxicumarina mostraron eficacia y potencia en el modelo de tráquea aislada de rata	Sánchez-Recillas et al., 2014a,b.
Se evaluaron 9 derivados sintéticos de 1,3-diaminopropano-2-ol	El compuesto 1-(Acetidin-1-il)-3-((furan-2-ilmetil)(4-metoxifenil)amino)propan-2-ol fue 100% eficaz y más potente que teofilina (fármaco de referencia)	López et al., 2017.
Extracto diclorometano de la especie vegetal <i>Cordia dodecandra</i>	El extracto mostró efecto relajante significativo, atribuido al incremento de AMPc y bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje	Sánchez-Recillas et al., 2019.

Tabla 2. Modelos de evaluación farmacológica empleados en la búsqueda de fármacos antiasmáticos (continuación).

Muestra evaluada	Principales hallazgos	Referencias
Extracto hexánico de la especie vegetal <i>Achillea millefolium</i> y sus compuestos bioactivos	El extracto y los compuestos Leucodina y Achilina mostraron efecto relajante significativo, a través de bloqueo de canales de calcio	Arias-Durán et al., 2020.
Evaluación relajante del músculo liso de las vías aéreas (ex vivo e in silico)		
Se hizo un análisis de 10 flavonoides, comparando su actividad farmacológica en un modelo <i>ex vivo</i> , y comparando su estructura química con su potencia	Los valores eficacia y potencia de cinco clases de flavonoides indicaron que las flavonas eran más potentes que los flavonoles; flavonas o sus posiciones 6-sustituidas o 7-sustituidas exhibieron la mejor actividad relajante	Flores et al., 2018.
Evaluación relajante del músculo liso de vías aéreas (ex vivo) y evaluación antialérgica (in vivo)		
6-hidroxi flavona (6-HOF), el derivado más activo de una serie de flavonoides. Se determinó el mecanismo de acción en un modelo <i>ex vivo</i> de anillos de tráquea aislada de rata, su evaluación antiasmática en un modelo <i>in vivo</i> de cobayo y su efecto toxicológico en modelo de ratón	Demostró que el 6-HOF ejerce una actividad relajante significativa, a través del bloqueo de los canales de calcio y, posiblemente, mediante la estimulación del sistema NO/cGMP en la tráquea de rata, así como un posible efecto antialérgico	Flores et al., 2019.

Referencias

Arias-Durán, L., Estrada-Soto, S., Hernández-Morales, M., Chávez-Silva, F., Navarrete-Vázquez, G., León-Rivera, I., Perea-Arango, I., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M. (2020). Tracheal relaxation through calcium channel blockade of *Achillea millefolium* hexanic extract and its main bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 253: 112643, ISSN 0378-8741. doi.org/10.1016/j.jep.2020.112643.

Barnes, P. J. (2006). Drugs for asthma. *British Journal of Pharmacology*, 147 (Suppl.): S297-303. doi.org/10.1038/sj.bjp.0706437.

Bates, J. H., Rincón, M., Irvin, C. G. (2009). Animal models of asthma. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 297(3): L401-L410. (<https://doi.org/10.1152/ajplung.00027.2009>).

Bazán-Perkins, B., Vargas, M. H., Sánchez-Guerrero, E., Chávez, J., Montañño, L. M. (2004). Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: Role of catecholamines and nitric oxide. *Experimental Physiology* 89(5): 623-628. (<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.027706>).

Billington, C. K. y Penn, R. B. (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*, 4(4): 1-23.

Blume, C. y Davies, D. E. (2013). In vitro and ex vivo models of human asthma. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2): 10-16. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.12.014.

Carrillo, G., Méndez-Domínguez, N., Datta-Banik, R., Figueroa-López, F., Estrella-Chan, B., Álvarez-Baeza, A., Garza, N. (2020). Asthma mortality and hospitalizations in Mexico from 2010 to 2018: Retrospective epidemiologic profile. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(14): 1-13. doi.org/10.3390/ijerph17145071.

Estrada-Soto, S., Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M. (2012). Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2): 513-518. doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.04.

Flores-Flores, A., Estrada-Soto, S., Millán-Pacheco, C., Bazán-Perkins, B., Villalobos-Molina, R., Moreno-Fierros, L., Hernández-Pando, R., García-Jiménez, S., Rivera-Leyva, J. C. (2019). Functional mechanism of tracheal relaxation, antiasthmatic, and toxicological studies of 6-hydroxyflavone. *Drug Development Research*, 80(2): 218-229. doi: 10.1002/ddr.21484.

Flores-Flores, A., Hidalgo-Figueroa, S., Villalobos-Molina, R. et al. (2018). Relaxant effect of structurally related flavonoids on isolated tracheal rat rings: a SAR study. *Med. Chem. Res.*, 27: 122-127. doi.org/10.1007/s00044-017-2055-y.

- Flórez, J., Armijo, J., Mediavill, Á. (2014). *Farmacología humana*. Quinta edición. Masson Multimedia, España (pp. 809-824).
- Forno, E., Gogna, M., Cepeda, A., Yáñez, A., Solé, D., Cooper, P., Ávila, L., Soto-Quiroz, M., Castro-Rodríguez, J. A., Celedón, J. C. (2015). Asthma in Latin America. *Thorax*, 70(9): 1-8. doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207199.
- Fox, S. (2013). *Fisiología humana*. Décima tercera edición. McGraw-Hill, China (pp. 393-397, 620-623, 628-629).
- Galli, S. J., Tsai, M., Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203): 445-454. doi: 10.1038/nature07204.
- GINA, P. (2022). Pocket guide for Asthma management and prevention. En: *GINA Global Initiative for Asthma*. (<https://ginasthma.org/gina-reports/>).
- Gómez, H. y Piskorz, D. (2013). *Hipertensión arterial, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica*. Primera edición. Editorial Inter-Médica, Argentina (pp. 77-80).
- Hall, I. (2000). Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *European Respiratory Journal*, 15(6): 1120-1127.
- Holmes, A. M., Solari, R., Holgate, S. T. (2011). Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug Discovery Today*, 16(15-16): 659-670. doi: 10.1016/j.drudis.2011.05.014.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2012). *Farmacología básica y clínica*. Décima segunda edición. McGraw-Hill, China (pp. 339-356).
- Kubo, M. (2017). Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunological Reviews*, 278(1): 162-172. doi.org/10.1111/imr.12557.
- López, F. I., De la Cruz, F. N., López, J., Martínez, J. M., Alcaraz, Y., Delgado, F., Sánchez-Recillas, A., Estrada-Soto, S., Vázquez, M. A. (2017). A simple method for the synthesis of 1,3-diaminopropan-2-ols derivatives and their ex-vivo relaxant activity on isolated rat tracheal rings. *Medicinal Chemistry Research*, 26(6): 1325-1335. doi.org/10.1007/s00044-017-1853-6.
- McFadzean, I. y Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal Pharmacology*, 135 (1): 1-13. doi.org/10.1038/sj.bjp.0704468.

- Merin, E. K., Lee, F. E. H., Lee, G. B. L. (2019). Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 56(2): 219-233. doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1.
- Mullane, K. y Williams, M. (2013). Animal models of asthma: Reprise or reboot? *Biochemical Pharmacology*, 87(1): 131-139. doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.026.
- Mullane, K. (2011). Asthma translational medicine: report card. *Biochemical Pharmacology*, 82(6): 567-585. doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.038.
- Ouderago, N. y Roux, E. (2014). Physiology of airway smooth muscle contraction: an overview. *Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine*, 4(6): 221-223. doi.10.4172/2161-105X.1000221.
- Palange, P. y Rohde, G. (2019). *ERS Handbook of Respiratory Medicine*. The European Respiratory Society, Reino Unido. (<https://doi.org/10.1183/9781849840798.erh01>).
- Passalacqua, G. y Ciprandi, G. (2008). Allergy and the lung. *Clinical and Experimental Immunology*, 153 (Suppl.): 12-16. doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03715.x.
- Sánchez-Recillas, A., Mantecón-Reyes, P., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Estrada-Soto, S. (2014a). Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(3): 179-183. doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60017-1.
- Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Ríos, M. Y., Ibarra-Barajas, M., Estrada-Soto, S. (2014b). Semisynthesis, ex vivo evaluation, and SAR studies of coumarin derivatives as potential antiasthmatic drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77: 400-408. doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.029.
- Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Millán-Pacheco, C., Aguilar-Guadarrama, B., Ortiz-Andrade, R., Estrada-Soto, S. (2014c). Relaxant effect 7-ethoxy-4-methyl-2H-chromen-2-one by calcium channel blockade: computational and ex vivo studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(1): 46-51. doi:10.7324/JAPS.2014.40107.

Sánchez-Recillas, A., Rivero-Medina, L., Ortiz-Andrade, R., Araujo-León, J. A., Flores-Guido, J. S. (2019). Airway smooth muscle relaxant activity of *Cordia dodecandra* A.DC. mainly by cAMP increase and calcium channel blockade. *Journal Ethnopharmacology*, 30 (229): 280-287. doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.013.

SENCT (2020). *Guía española para el manejo del asma Gema 5.0.* (www.gemas-ma.com).

Shin, Y. S., Takeda, K., Gelfand, E. W. (2009). Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 1(1): 10-18. doi.org/10.4168/aair.2009.1.1.10.

Vargas-Becerra, M. H. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y cirugía de tórax*, 68: 91-97.

Vargas, M. H., Sommer, B., Bazán-Perkins, B., Montaña, L. M. (2010). Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. *Veterinary Research Communications*, 34(7): 589-596. doi.org/10.1007/s11259-010-9430-1.

Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education*, 27(4): 201-206. doi.org/10.1152/advan.00025.2003.

Weersink, E. J. M., Postma, D. S., Aalbers, R., De Monchy, J. G. R. (1994). Early and late asthmatic reaction after allergen challenge. *Respiratory Medicine*, 88(2): 103-114. doi.org/10.1016/0954-6111(94)90021-3.

Capítulo 8.

Evaluación de compuestos bioactivos en modelos experimentales de afecciones del sistema nervioso central

María Eva González Trujano*
David Martínez Vargas*

* Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

8.1 Introducción

El dormir forma parte del ritmo biológico llamado sueño-vigilia, un ritmo circadiano del sistema nervioso central (SNC), cuyo ciclo completo de oscilación es de aproximadamente 24 horas y depende de áreas cerebrales como el núcleo supraquiasmático, que posee un mecanismo intrínseco de tiempo, el cual actúa como un reloj biológico o marcapaso único genéticamente determinado y se sincroniza con los ciclos de luz y oscuridad (Brown et al., 2012).

El sueño se define como un fenómeno fisiológico periódico en el cual se suspende la interrelación con el medio externo, alternando cíclicamente con la vigilia. El término deriva del latín *somnum* que significa estado normal, recurrente y reversible, en el cual disminuye la percepción y la capacidad de respuesta al medio ambiente. Este estado dinámico depende de grupos de neuronas activas que desempeñan un papel diferente al de la vigilia, y es un proceso crucial para un rendimiento cognitivo óptimo que incluye la atención, la reactividad emocional, el aprendizaje y la memoria, el fortalecimiento del sistema inmunitario y procesos fisiológicos como la salud endocrina y metabólica (Carley y Farabi, 2016; Miletínová y Bušková, 2021). De hecho, descubrimientos recientes han demostrado que el sueño es esencial para la eliminación de desechos metabólicos que permiten mantener la salud fisiológica del cerebro (Lewis, 2021).

El sueño es casi omnipresente en todo el reino animal, se observa en gusanos, moscas, moluscos, así como en vertebrados (Keene y Duboue, 2018). La evaluación de los estados de sueño/vigilia se puede realizar mediante la observación del comportamiento, en registros electrofisiológicos o con una combinación de ambos. Electrofisiológicamente, se pueden identificar tres diferentes estados de vigilancia en función del nivel de alerta y los cambios en las ondas cerebrales registradas con el electroencefalograma (EEG):

1. Vigilia.
2. Sueño sin movimientos oculares rápidos (No-MOR), también llamado sueño de ondas lentas.
3. Sueño de movimientos oculares rápidos (MOR).

El electroencefalograma (EEG) y el electromiograma son excelentes biomarcadores para distinguir los distintos estados de vigilia y el sueño, lo que hace que el ciclo sueño-vigilia sea cuantificable. Durante la vigilia, el EEG muestra ondas de baja amplitud y frecuencia rápida (EEG desincronizado), mientras que el electromiograma muestra cantidades variables de actividad muscular. Por el contrario, durante el sueño No-MOR, el EEG presenta actividad de alta amplitud y baja frecuencia entre 0.5 a 4.5 Hz (EEG sincronizado), junto con husos de sueño de 9 a 15 Hz donde la actividad muscular disminuye en comparación con la vigilia. El sueño MOR se asocia con sueños vívidos, también denominado sueño paradójico, ya que se caracteriza por un EEG desincronizado que se asemeja al de la vigilia, mientras que el electromiograma presenta una parálisis completa de los músculos posturales (Weber y Dan, 2016; Scammell *et al.*, 2017).

Las proporciones de tiempo que el animal pasa en los estados de vigilia, No-MOR y MOR y los patrones temporales de las transiciones de estado varían ampliamente entre las especies (Brown *et al.*, 2012; Keene y Duboue, 2018). Sin embargo, hay algunas características bien conservadas; por ejemplo, los animales normalmente ingresan al sueño MOR desde el sueño No-MOR, pero no directamente desde la vigilia, condición que caracteriza a la narcolepsia (Brown *et al.*, 2012).

Las perspectivas sobre la biología del sueño han cambiado en los últimos años, el uso de diferentes técnicas para medir y controlar la actividad de tipos específicos de células y la disección de sus conexiones sinápticas han facilitado la investigación de los mecanismos que controlan el sueño (Weber y Dan, 2016). Se han ido identificando diversos sistemas de neurotransmisión que regulan selectivamente la instalación y duración de cada una de las fases del ciclo sueño-vigilia. La vigilia está regulada por neurotransmisores localizados en una extensa red de estructuras y vías subcorticales. Los principales neuroquímicos de este “sistema de excitación ascendente” incluyen a la norepinefrina del locus coeruleus, la serotonina de los núcleos del rafe, la histamina del núcleo tuberomamilar, la dopamina de la sustancia gris periacueductal ventral, la acetilcolina del tegmento pedunculopontino y el tegmento laterodorsal de la protuberancia, y la orexina del área perifornical que inervan de forma difusa la corteza cerebral, el cerebro anterior basal, el hipotálamo lateral, entre otras regiones (Weber y Dan, 2016; Scammell *et al.*, 2017).

Las neuronas monoaminérgicas presentan patrones de disparo alto durante la vigilia, el cual disminuye durante el sueño No-MOR y cesan durante el sueño MOR (Brown et al., 2012; Scammell et al., 2017). El inicio y mantenimiento del sueño requiere de la supresión de la actividad en los sistemas de excitación ascendente, y esto sucede cuando las neuronas que promueven la vigilia son inhibidas por descargas gabaérgicas originadas en el área preóptica ventrolateral del hipotálamo que actúa como un interruptor para el comienzo del sueño (Carley y Farabi, 2016; Weber y Dan, 2016).

La alternancia entre el sueño No-MOR y MOR es controlada por varios mecanismos de neurotransmisión, incluida una interacción recíproca entre dos poblaciones de neuronas, las glutamatérgicas REM-on del tegmento pedunculopontino y el tegmento laterodorsal del tronco encefálico, y las neuronas serotoninérgicas/noradrenérgicas REM-off del rafe y el *locus coeruleus*. Cuando inicia el sueño MOR, las neuronas REM-on presentan un aumento en su patrón de disparo, mientras que las neuronas REM-off permanecen silentes (Brown et al., 2012; Carley y Farabi, 2016).

En la Figura 1 se muestra un esquema simplificado de los núcleos y neurotransmisores implicados en la regulación de la vigilia y el sueño MOR (símbolos en rojo), con proyecciones ascendentes a la corteza relacionadas con la actividad rápida cortical (desincronización EEG), y algunas otras con proyecciones descendentes a la médula espinal que estimulan la actividad muscular. También se muestran las regiones cerebrales que están activas durante el sueño (símbolos azules y verdes), con proyecciones ascendentes a la corteza que promueven la actividad cortical lenta, y con proyecciones descendentes al tronco encefálico y la médula espinal que disminuyen la excitación conductual y el tono muscular (Jones, 2005).

8.2 Alteraciones más frecuentes del sueño. Insomnio

Los trastornos del sueño son alteraciones relacionadas con el proceso de dormir, ya sea en sus etapas de inicio, mantenimiento y duración del ciclo sueño-vigilia. En la consulta médica el insomnio es el trastorno del sueño más recurrente, tan solo en adultos afecta aproximadamente al 30 % de la población (Anderson y Bradley, 2013).

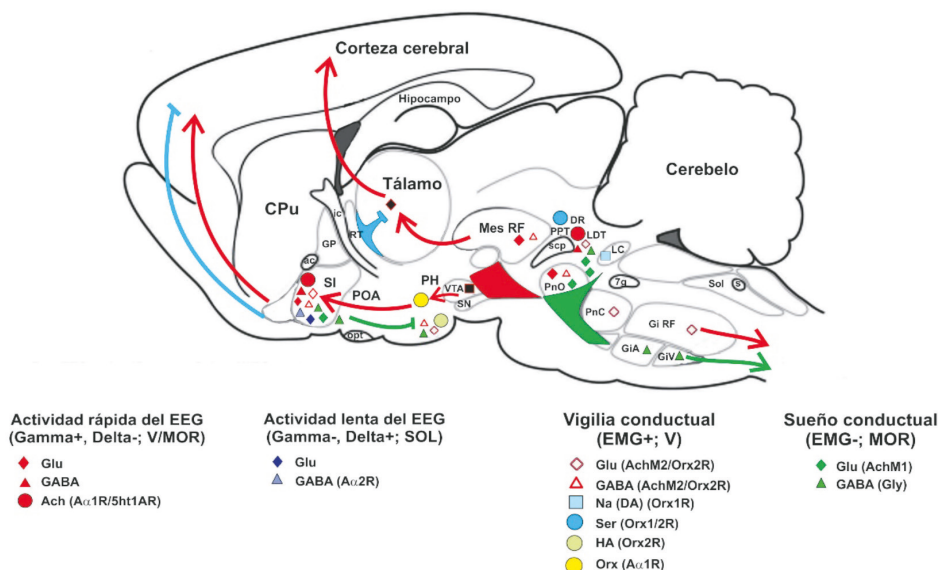


Figura 1. Representación gráfica de un cerebro de rata donde se esquematizan los núcleos y neurotransmisores implicados en la regulación del ciclo sueño-vigilia. Abreviaturas: EEG, electroencefalograma; EMG, electromiograma; V, vigilia; SOL, sueño de ondas lentas; MOR, sueño de movimientos oculares rápidos; Ach, acetilcolina; Glu, glutamato; NA, noradrenalina; H, histamina; Orx, orexina; CPu, putamen-caudado; ac, comisura anterior; SI, sustancia innominata; GP, globus pallidus; ic, cápsula interna; Rt, núcleo reticular del tálamo; POA, área preóptica; opt, tracto óptico; PH, hipotálamo posterior; TM, núcleo tuberomamilar; VTA, área tegmental ventral; SN, sustancia nigra; Mes RF, formación reticular mesencefálica; scp, pedúnculo cerebeloso superior; PnO, reticularis pontis oralis; PPTg, núcleo pedúnculo pontino tegmental; LDTg, núcleo tegmental latero-dorsal; PnC, reticularis pontis caudalis; LC, locus coeruleus; 7g, séptimo nervio; Gi, núcleo gigantocelular; GiA, gigantocelular anterior; GiV, gigantocelular ventral; Sol, núcleo del tracto solitario; s, tracto solitario. Modificado de Jones, 2005.

El término *insomnio* se refiere a la percepción subjetiva de sueño insuficiente o no restaurador, a pesar de la oportunidad adecuada para dormir. Lo anterior conlleva a fatiga o malestar, deterioro de la memoria, falta de concentración y atención, pobre desempeño escolar, afección en la relación social y/o profesional, cambios en el estado de ánimo, somnolencia diurna, disminución de la motivación, decremento en la energía e iniciativa, proclividad a los errores y accidentes, tensión, dolor de cabeza, síntomas gastrointestinales como respuesta a la pérdida y a la preocupación por el sueño (Moul et al., 2002; Edinger et al., 2004; Edinger y Means, 2005).

En cuanto a los mecanismos fisiológicos que subyacen al insomnio, se ha demostrado que está íntimamente relacionado con la hiperactividad en los sistemas neurales de la excitación, debido a un desequilibrio de las influencias excitadoras e inhibitoras. Al respecto, el aminoácido inhibitor ácido gamma aminobutírico (GABA) desempeña un papel importante en la etiología y/o persistencia del insomnio.

1. Los métodos fisiológicos de neuroimagen y cognitivos demuestran una hiperactivación en pacientes con insomnio, que puede estar relacionada con un desequilibrio de las influencias excitadoras e inhibitoras del SNC, en las que el GABA puede potencialmente desempeñar un papel fundamental (Nofzinger *et al.*, 2004).
2. En pacientes con insomnio los niveles cerebrales promedio de GABA son 30 % inferiores, en comparación con sujetos sanos (Winkelman *et al.*, 2008).
3. Las benzodiazepinas (BDZs), como fármacos que actúan en sitios alostéricos del receptor GABA_A, son eficaces en el tratamiento del insomnio al aumentar la actividad en las neuronas GABAérgicas (Gottesman, 2002).
4. Las neuronas en el núcleo preóptico ventrolateral que contienen GABA promueven el sueño a través de la supresión de los sistemas de activación del SNC en el núcleo tuberomamilar y los sistemas monoaminérgicos del tronco del encéfalo (Saper *et al.*, 2005). Se ha reportado que sujetos con insomnio presentan elevación de la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, los niveles de catecolaminas, la respuesta al estrés, y otros cambios fisiológicos en comparación con sujetos sanos, lo cual sustenta la conceptualización del insomnio como un trastorno de hiperactivación.

8.2.1 Epidemiología

Los síntomas del insomnio afectan del 30 % al 50 % de la población adulta no sólo en México (Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2016), sino también a nivel mundial (Ancoli-Israel y Roth, 1999). El grupo de edad con mayor prevalencia es de los 40 a los 60 años y está asociado con mayor mortalidad y con la incidencia

de obesidad, hipertensión, diabetes y enfermedad cardiovascular (Edinger y Means, 2005; Sarrais y De Castro-Manglano, 2007; Sánchez-Cárdenas et al., 2016), también con el trabajo por turnos y el desempleo o menor estatus socioeconómico (Edinger y Means, 2005). Los trastornos específicos del insomnio se presentan con un 5 % a 10 %, mientras que los síntomas de insomnio con estrés o deterioro (trastorno de insomnio general) se asocian con el 10 % al 30 % (Sarrais y De Castro-Manglano, 2007).

8.2.2 Síntomas

Las características específicas que permitirán un mejor diagnóstico y terapéutica del insomnio se basan en: duración, gravedad o repercusión en el estado de vigilia y naturaleza; características del ciclo sueño-vigilia (sobre todo en el insomnio crónico); exploración física y psicológica completa y resultado de las pruebas complementarias, como el polisomnograma (registro simultáneo del EEG, electrooculograma, electromiograma, entre otras), test de latencia de sueño múltiple y actigrafía (Ford y Kamerow, 1989; Edinger y Means, 2005). Los estudios polisomnográficos realizados en pacientes con insomnio muestran alteraciones en la estructura del sueño (aumento de la latencia del mismo, frecuentes despertares) y reducción de la cantidad total de sueño (Ford y Kamerow, 1989; Edinger y Means, 2005).

8.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico debe sustentarse en una historia clínica completa con los siguientes aspectos:

1. Registro del sueño con valoración basal del problema y, en su caso, la efectividad o no del tratamiento empleado, así como de las consecuencias del trastorno en la calidad de vida del paciente.
2. Considerar a la depresión u otros trastornos psiquiátricos como factores etiológicos, y realizar un registro polisomnográfico en pacientes con tratamiento no exitoso, alteraciones de conducta durante el sueño, diagnóstico inicial incierto o con trastornos relacionados con la respiración o movimientos periódicos de las piernas (Sarrais y De Castro-Manglano, 2007).

8.2.4 Clasificación

Para el diagnóstico de insomnio, la clasificación de enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (OMS, décima revisión: CIE-10 o DSM-IV) requiere que la dificultad para iniciar o mantener el sueño, o no tener un sueño reparador, dure por lo menos un mes y que, además, se acompañe de fatiga diurna, sensación de malestar personal significativo y deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad personal. La Tabla 1 describe la comparación de los trastornos del sueño, de acuerdo con los dos documentos mencionados.

8.2.5 Terapéutica

El tratamiento debe basarse en su origen, severidad y duración. La mayoría de los insomnios son secundarios a alguna enfermedad, por tanto, su tratamiento deberá considerar el resolver la causa que lo induce. Existen técnicas de terapia conductual y de higiene del sueño que han demostrado una eficacia a largo plazo, sin necesidad de fármacos. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes es imprescindible el uso de fármacos hipnóticos, para los que se recomienda un protocolo de acción según la gravedad y características del insomnio (Salín-Pascual, 2006). El hipnótico ideal será aquel con un inicio de acción rápido, con restablecimiento de la latencia del sueño normal, una acción hipnótica mantenida durante toda la noche que evite todo lo posible los microdespertares, y con mínimos efectos adversos diurnos del tipo somnolencia, aturdimiento matutino o disminución de los reflejos (Salín-Pascual, 2006; Sarrais y De Castro-Manglano, 2007) (ver Tabla 2 sobre terapia del insomnio).

En pacientes con insomnio, el tratamiento farmacológico suele implicar somníferos que actúan como agonistas de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A, como las benzodiacepinas (BDZs) y los fármacos “Z” (zolpidem, zaleplon, zopiclone) (Ebert et al., 2006; Sánchez-Cárdenas et al., 2016) que potencian la acción de las neuronas GABAérgicas promotoras del sueño. En las últimas dos décadas se han introducido otros compuestos para promover el sueño, que no implican principalmente la manipulación del sistema GABAérgico, como el agonista del receptor de melatonina ramelteon (Pandi-Perumal et al., 2008); ritanserín, un antagonista de los receptores 5-HT_{2A}

Tabla 1. Clasificación del insomnio de acuerdo con el DSM-IV y CIE-10 (modificado de Sarrais y De Castro-Manglano, 2007).

DSM-IV	CIE-10
Trastornos primarios	Trastornos no orgánicos
Disomnias	Disomnias
1. Insomnio primario 2. Hipersomnia primaria 3. Narcolepsia 4. Trastorno del sueño relacionado con la respiración 5. Trastorno del ritmo circadiano (antes trastorno del ritmo sueño-vigilia) • Tipo sueño retrasado • Tipo 'jet lag' • Tipo de sueño avanzado • Tipo cambios de turno de trabajo • Tipo no especificado 6. Mioclonía nocturna o movimiento periódico de los miembros 7. Síndrome de piernas inquietas	• Insomnio no orgánico • Hipersomnia no orgánica • Trastorno no orgánico del ciclo sueño-vigilia
Parasomnias	Parasomnias
• Sonambulismo • Terrores nocturnos • Pesadillas • Bruxismo • Enuresis nocturna	• Sonambulismo • Terrores nocturnos • Pesadillas
Trastornos secundarios del sueño	Otros trastornos no orgánicos del sueño
• Asociado a trastorno neurológico • Asociado a trastorno psiquiátrico • Asociado a otras enfermedades médicas	Trastorno no orgánico del sueño de origen sin especificación
	Trastornos orgánicos del sueño

y 5-HT_{2C} (Viola et al., 2002); y antidepresivos como la trazadona (Mendelson, 2005) y agomelatina, un compuesto que actúa como antagonista serotoninérgico 5-HT_{2C} y agonista del receptor de melatonina (Montgomery y Kasper, 2007). Otros compuestos utilizados para tratar el insomnio son los que antagonizan a la neurotransmisión orexinérgica (suvorexant) o histaminérgica (antihistamínicos) promotores de la vigilia (Sateia et al., 2017).

Tabla 2. Terapéutica del insomnio
(modificado de Sarrais y De Castro-Manglano, 2007).

Tratamiento no farmacológico	
1. Hábitos de higiene del sueño	
2. Terapias conductuales	
a. Control de estímulos	Objetivo de reasociar la cama a un inicio rápido del sueño.
b. Intención paradójica	Para quitar el miedo o ansiedad ante la posibilidad de acostarse y no dormir, se le pide al paciente que intente pasar en vela la noche entera en vez de esforzarse por conciliar el sueño.
c. Relajación muscular progresiva	Intenta una relajación mental mediante una profunda relajación física.
3. Psicoterapia cognitivo-conductual	Modificar y controlar pensamientos negativos y ansiógenos que aparecen al acostarse cuando se deja de hacer cosas que ocupaban el pensamiento antes de acostarse.
Tratamiento farmacológico	
1ª línea. Sustancias naturales	
2ª línea. Hipnóticos no benzodiazepínicos	
3ª línea. Benzodiazepinas	
4ª línea. Antidepresivos de efecto sedante	
5ª línea. Neurolépticos sedantes	
6ª línea. Otros: antihistamínicos, melatonina, clormetiazol, gabapentina	

Los hipnóticos no son recomendables para el tratamiento del insomnio crónico, debido a que producen dependencia psicológica y física con rapidez (Ashton, 1994; O'brien, 2005). Otra razón es que una sobredosis relativamente pequeña de estos medicamentos puede resultar letal por depresión respiratoria y cardiovascular. Una opción más segura es la melatonina, hormona que regula el ritmo circadiano de sueño-vigilia. La secreción de ésta disminuye con la edad y puede contribuir, parcialmente, en la etiología de los trastornos del sueño de ancianos. Sustancias como tabaco, alcohol y otros fármacos (BDZs, calcio-antagonistas, antiinflamatorios no esteroideos, fluoxetina y esteroides) disminuyen la producción de melatonina. Como se mencionó previamente, otros fármacos usados en el tratamiento del insomnio incluyen antihistamínicos, sedantes o algunos antidepresivos. Las técnicas de relajación,

de estímulo control, de restricción de sueño o cognitivas, han demostrado su eficacia solas o en combinación con la terapia farmacológica.

8.2.6 Modelos experimentales para el estudio de alteraciones del sueño

El uso de animales de laboratorio en las ciencias biomédicas representa una herramienta fundamental para la investigación básica, que permite el desarrollo de importantes avances en la prevención y tratamiento de las enfermedades. También es una herramienta esencial para la docencia de las ciencias biológicas, encargada de capacitar a los profesionales de la salud en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos.

Los parámetros electrofisiológicos que se emplean para definir los estados de sueño y vigilia, los cuales presentan una relación temporal en los cambios de la actividad, se denominan polisomnografía, la cual era posible

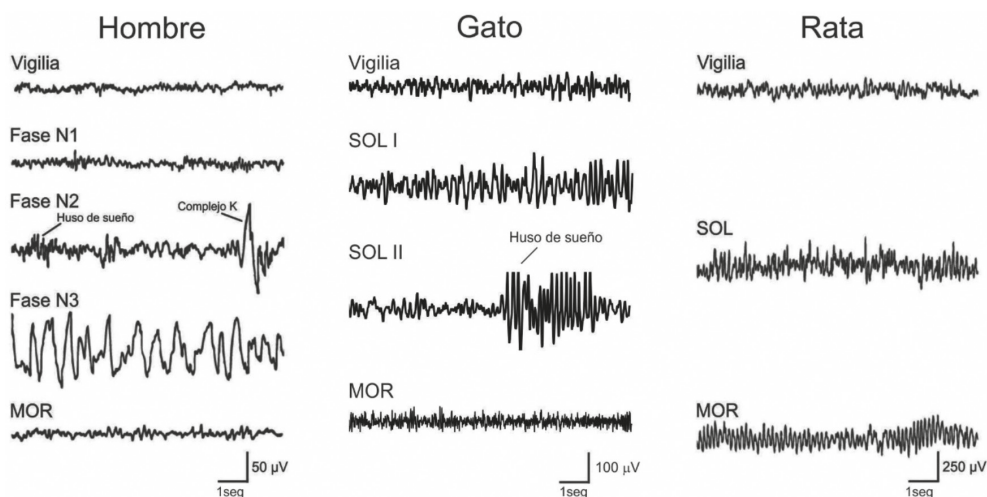


Figura 2. Fases del ciclo sueño-vigilia en el hombre, el gato y la rata. A la izquierda se presenta la actividad EEG cortical del hombre durante la vigilia, el sueño de ondas lentas (SOL), clasificadas como N1, N2 y N3, y el sueño, de movimientos oculares rápidos (MOR) (Clasificación de la Academia Americana de Medicina del Sueño, establecida en el 2007). Al centro y a la derecha se presenta la actividad cerebral homóloga en el gato y la rata. Modificado de Brown *et al.*, 2012.

estudiar en gatos, hace algunos años, y actualmente se realiza en su mayoría en roedores (rata y ratón) (Figura 2).

Los parámetros del estudio polisomnográfico son la latencia al inicio de cada una de las fases de sueño, así como la duración promedio y tiempo total de cada una de las fases del ciclo sueño-vigilia. Los registros suelen tener una duración de ocho horas en humanos, en tanto que en animales de experimentación son en mayor medida de seis a ocho horas, aunque pueden tener una duración de hasta 24 horas. Pocos estudios son realizados en ratón, los cuales ofrecen la ventaja de poder evaluar diferentes dosis de un fármaco con un gasto diez veces menor al requerido en rata. Es de gran utilidad, sobre todo en el “screening” o cernimiento farmacológico y búsqueda de mecanismos de acción. Una posible desventaja o limitante podría ser la disposición de un equipo de estereotaxia para la colocación de los electrodos y los sistemas de registro (Figura 3).

El modelo de potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico es uno de los más comunes para la búsqueda de sustancias con actividad depresora en el SNC. Este modelo consiste en la administración simultánea o previa del tratamiento de prueba y una dosis subanestésica del barbitúrico sedante-hipnótico (42 mg/kg, i.p. en ratón o 35 mg/kg, i.p. en rata). Enseguida,

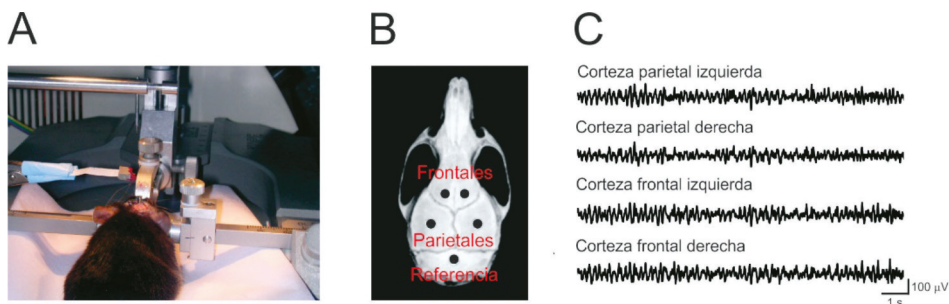


Figura 3. Fotografías que muestran la ubicación de un ratón en el aparato estereotáxico para la cirugía e instalación de electrodos en el cerebro y posterior registro de la actividad EEG (A). El registro requiere de establecer los sitios de registro, los cuales pueden ser colocados en ambas cortezas, frontales y parietales, requiriendo de la trepanación del cráneo en dichos sitios (B). Entonces se puede obtener el registro basal, el cual se ejemplifica en un caso de actividad EEG siete días después de la cirugía y después de la administración de solución fisiológica (C).

los parámetros de latencia y duración de la sedación y de la hipnosis inducida con el pentobarbital sódico, son registrados mediante la observación de conductas como la incoordinación motora y la pérdida del reflejo de enderezamiento (Figura 4 y Tabla 3). Cabe hacer mención que el modelo de potenciación de la sedación inducida con pentobarbital sódico, ha sido uno de los ensayos más utilizados para evaluar el efecto sedante de diferentes productos naturales (González-Trujano et al., 2006a; Martínez et al., 2006).



Figura 4. Evaluación de la potenciación del sueño inducido en presencia de pentobarbital sódico en ratones. Nótese la pérdida del reflejo de enderezamiento en la fase hipnótica.

Tabla 3. Pentobarbital sódico (SP, 42 mg/kg) induce potenciación de su efecto sedante e hipnótico en ratones administrados con diazepam (DCP), en comparación con el grupo que recibe vehículo (VH).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia (min)		Duración de la hipnosis (min)
		Sedación	Hipnosis	
SP + VH	—	1.22 ± 0.04	3.09 ± 0.21	17.92 ± 4.19
SP + DCP	1	0.95 ± 0.033 [#]	2.97 ± 0.29	51.94 ± 6.09 [*]

^{*} $p < 0.05$, ANADEVA seguida de la prueba post-hoc de Dunnett. [#] $p < 0.05$, T de Student.

8.2.7 Investigación de compuestos bioactivos para el insomnio

Los roedores y el humano son especies que comparten más de 90 % de sus genes, por lo que los modelos experimentales para evaluar estrategias terapéuticas para el insomnio, la ansiedad y la epilepsia en estos animales, resultan ser una herramienta de utilidad para la aplicación terapéutica en el humano.

Durante siglos, las plantas o derivados de éstas se han utilizado con fines terapéuticos para tratar el insomnio, y en la actualidad su uso está aumentando en todo el mundo (Borrás et al., 2021; Bruni et al., 2021). Las organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), también están haciendo más esfuerzos y prestando más atención al desarrollo y promoción de la calidad de los productos naturales (Parveen et al., 2015). Además, las terapias no farmacéuticas, especialmente para afecciones y síntomas leves a moderados como el insomnio no grave y para los adultos mayores, son muy recomendables como terapias de primera línea antes de la medicación farmacológica (Sarris et al., 2011).

Algunos ejemplos de especies de plantas usadas para el tratamiento del insomnio son la valeriana (*Valeriana officinalis* L. o *V. edulis* spp. *procera*), la pasiflora (*Passiflora incarnata* L.) y el toronjil (*Agastache mexicana* L.) (González-Trujano et al., 2015; Bruni et al., 2021). Numerosas investigaciones se han dedicado a determinar los compuestos específicos involucrados en las propiedades sedantes de las plantas medicinales, tales investigaciones han destacado que los cambios en la neurotransmisión GABAérgica a nivel central podrían ser responsables de las propiedades sedantes-hipnóticas de estos productos naturales (Shi et al., 2014; Borrás et al., 2021; Bruni et al., 2021). Aunque otros mecanismos también pueden estar involucrados, incluyendo la vía dopaminérgica (Sarris y McIntyre, 2017).

En el caso del extracto de raíz de valeriana, éste contiene más de 150 constituyentes químicos que incluyen alcaloides, terpenos, ácidos orgánicos y sus derivados, valepotriatos y flavonas. Los estudios en cultivos de tejidos y modelos animales, sugieren que los componentes del extracto de valeriana poseen actividad agonista del receptor GABA_A dependiente de la dosis. La 6-metilapigenina es un modulador positivo de este receptor, posiblemente por su unión al sitio de las BDZs entre las subunidades α y γ ,

mientras que el ácido valerénico y el valerenol interactúan con la subunidad β del receptor (Shi *et al.*, 2014).

Actualmente, las terapias que se están probando para determinar su eficacia en el insomnio incluyen combinaciones de extractos de hierbas con fármacos de la clínica (Oliva *et al.*, 2004; Ugalde *et al.*, 2005), tal como la combinación con melatonina y la vitamina B6 (Lemoine *et al.*, 2019). La eficacia de las plantas medicinales depende de la duración del tratamiento, tipos de sujetos de estudio, vías de administración y métodos de tratamiento. Son necesarios los ensayos clínicos con un diseño adecuado y estandarizado, así como más estudios preclínicos para seguir estudiando los posibles mecanismos de acción.

8.3 Ansiedad

La ansiedad es la más común y universal de las emociones, ésta cumple con una función adaptativa y prepara al individuo para la ejecución de tareas o alertas frente a posibles amenazas. Sin embargo, ésta puede llegar a ser patológica cuando no se presenta como respuesta proporcionada frente a un estímulo, o si su intensidad o duración excede los límites aceptables, puesto que perderá su función de adaptación y se convertirá en un problema de salud para el individuo (Gómez *et al.*, 2002; Meaney *et al.*, 2015).

El estrés crónico reduce los niveles cerebrales de GABA. Otros neurotransmisores también participan, entre ellos las monoaminas, como la serotonina, la noradrenalina y la dopamina están involucradas en la fisiopatología de los trastornos por ansiedad (Heinze y Camacho, 2010). Los efectos ansiolíticos de los antidepresivos se deben a la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo dorsal. Además, las hormonas también pueden ejercer acciones ansiolíticas por la modulación del receptor GABA_A. En general, el sustrato neuroanatómico comprometido es el *locus coeruleus*, el sistema límbico, la amígdala, el tálamo, el hipocampo y el hipotálamo (Heinze y Camacho, 2010; Meaney *et al.*, 2015).

8.3.1 Epidemiología

Encuestas orientadas a establecer la prevalencia de trastornos psiquiátricos en la población han demostrado que los trastornos de ansiedad son

extremadamente comunes. En los Estados Unidos de América, la Réplica de la Encuesta Nacional de Comorbilidad (NCS-R, por sus siglas en inglés) encontró que casi el 30 % de los adultos sufren de al menos una de estas afecciones a lo largo de sus vidas (Kessler et al., 2005). En México, de manera similar, la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica (ENEP) reportó que el 28.6 % de la población presentó alguna vez en su vida algunos de los 23 trastornos incluidos en la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE), siendo los trastornos de ansiedad los más frecuentes (14.3 % alguna vez en la vida). Las mujeres presentan prevalencias globales más elevadas. Donde las fobias son muy comunes (7.1 % alguna vez en la vida), seguidas por los trastornos de conducta (6.1 %), la dependencia al alcohol (5.9 %), la fobia social (4.7 %) y el episodio depresivo mayor (3.3 %) (Medina-Mora et al., 2003).

8.3.2 Síntomas

Los síntomas principales de la ansiedad son el miedo y la inseguridad. Estos síntomas no son los que de forma habitual un individuo podría presentar ante una situación estresante común como un examen, un viaje, un imprevisto doméstico o cualquier conflicto social. Los síntomas de la ansiedad están presentes durante meses, normalmente medio año, antes de iniciarse cualquier tratamiento (Meaney et al., 2015). La consecuencia es que la evolución natural de estas enfermedades, si no se tratan, es hacia la cronificación y el empeoramiento. Los síntomas de la ansiedad y el estrés no son solo psíquicos, sino también afectan al resto del cuerpo, por lo que es necesario siempre en primer lugar descartar que se trate de otra enfermedad médica o que se presenten ambas simultáneamente. Por otro lado, es frecuente que los trastornos de ansiedad se acompañen de otras enfermedades psiquiátricas, principalmente trastornos afectivos, trastornos de personalidad de tipo ansioso o abuso de tóxicos como el alcohol, tabaco, excitantes y sustancias ilegales.

El miedo está incluido como una de las cinco emociones fundamentales del ser. Cuando se refiere miedo se trata de una emoción o una respuesta psicológica, comportamental o fisiológica, respecto de un estímulo potencialmente peligroso (ya sea éste una situación, un predador o un objeto)

(Heinze y Camacho, 2010; Meaney et al., 2015). El miedo es por tanto uno de los elementos básicos para la definición de los trastornos de ansiedad.

8.3.3 Diagnóstico

El diagnóstico de los trastornos de ansiedad se basa en la historia clínica. Existe la posibilidad de usar escalas de medición de la ansiedad que ayudan en este diagnóstico. Se encuentran el Hamilton de ansiedad (HAS), el inventario del estado de ansiedad (ASI), inventario del estado-rasgo de ansiedad (STAI), lista de síntomas-90 (SCL-90-R), inventario de ansiedad de Beck (BAI), la escala de autoevaluación de ansiedad (SRAS), entre otras. El diagnóstico diferencial depende del tiempo, la duración, el número y la severidad de los síntomas.

8.3.4 Clasificación

Los principales trastornos de ansiedad incluidos en el Manual de Diagnóstico y Estadísticas de Enfermedades Mentales (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV) son los siguientes: ansiedad generalizada, pánico con o sin agorafobia, fobia social, fobia específica, trastorno obsesivo-compulsivo y, finalmente, el trastorno por estrés postraumático. Llama la atención que este orden no ha variado en lo fundamental durante un siglo. El marco clínico descrito antes ha dejado furtivo un fenómeno de gran importancia conceptual y clínica, y cuya estructura puede ser orientadora para cualquier explicación que se intente en este campo. Es decir, dos grandes factores se desprenden de las constataciones descriptivas iniciales de los trastornos de ansiedad: el miedo frente a la naturaleza y el miedo frente al encuentro interpersonal.

Las características de la ansiedad generalizada son la aparición progresiva y permanente de síntomas intensos de ansiedad, sin una causa real que las provoque. Las manifestaciones son fatiga, inquietud, dificultad para dormir, irritabilidad, tensión muscular. El individuo está preocupado permanentemente sin motivos aparentes y no lo puede controlar. En el trastorno de pánico existe la aparición brusca de un miedo intenso con manifestaciones de temblor, sudoración, miedo a morir, sensación de frío/calor, náuseas, sensación de asfixia, mareo, miedo a perder el control, dolor en el pecho. Puede aparecer espontáneamente o ser provocado por algún estímulo.

En las fobias se tiene un temor angustioso a determinada circunstancia real o imaginaria. Las manifestaciones son variables dependiendo del tipo de fobia: en la fobia específica puede existir miedo a un objeto o situación determinada; en la fobia social el miedo a colocarse en una situación vergonzosa en un medio social; en la agorafobia el miedo es a encontrarse en cualquier situación que pueda provocar un ataque de pánico o de la cual le sea difícil escapar, lo que hace que la persona se encierre en casa con la finalidad de evitar la situación que provoca el temor.

En el trastorno obsesivo-compulsivo, las obsesiones que se presentan como ideas o pensamientos son repetitivos y no desaparecen de la mente del individuo, aunque lo intente por todos los medios. Cada obsesión se asocia a una compulsión o conducta que compensa la angustia que provoca. En lo que respecta al estrés postraumático se caracteriza en aquellos individuos que han estado expuestos a algún evento traumático que involucra un daño físico o psicológico extremo. Las manifestaciones son de pérdida de sueño, irritabilidad, sobresalto y falta de concentración que provoca alteraciones a nivel familiar, laboral y social del individuo (Lozano, 2000).

Finalmente, es importante señalar que la expresión “los nervios” también se asocia con el concepto de ansiedad. Éste es un término de filiación cultural que se utiliza para describir una alteración del estado emocional causado por un susto, una impresión fuerte, conflictos sociales, dificultades familiares, económicas y laborales que originan intranquilidad.

8.3.5 Terapéutica

Entre los tratamientos más utilizados para los trastornos de ansiedad están la psicoterapia y los medicamentos. Es posible que se obtenga mayor beneficio con una combinación de ambos. La terapia cognitiva conductual es la manera más eficaz de la psicoterapia para tratar los trastornos de ansiedad. Generalmente, la terapia cognitiva conductual es un tratamiento a corto plazo y se enfoca en enseñar técnicas específicas para mejorar síntomas y poder gradualmente volver a las actividades que se evitan como consecuencia de la ansiedad (Kaczkurkin y Foa, 2015). El tratamiento incluye terapia de exposición al objeto o la situación que provoca ansiedad, de modo que tiene la finalidad de desarrollar confianza para controlar la situación y los síntomas de ansiedad.

En muchos de los casos de ansiedad se puede utilizar la terapia farmacológica. Los fármacos ansiolíticos son sustancias depresoras del SNC con propiedades tranquilizantes en dosis relativamente bajas y con efectos sedantes-hipnóticos en dosis altas. Dentro de los grupos de fármacos ansiolíticos se encuentran las BDZs y los fármacos no benzodiacepínicos (Ashton, 1994; Meaney *et al.*, 2015). Las BDZs son eficientes en los casos de ansiedad persistente, sin embargo, son menos eficaces en casos de crisis de pánico y de neurosis obsesiva. La acción ansiolítica es mediada por receptores GABA_A, en particular en los que contienen la subunidad $\alpha 2$. Las BDZs potencian la respuesta al GABA facilitando la frecuencia de apertura de los canales de cloruro activados por éste, lo que produce la hiperpolarización de la neurona y por lo tanto el estado de inhibición (Figura 5A). Es importante informar que las BDZs pueden desarrollar toxicidad derivada de una sobredosis aguda o efectos de dependencia y tolerancia (Ashton, 1994; O'brien, 2005).

Dentro del grupo de fármacos no benzodiacepínicos se encuentran los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) y agonistas

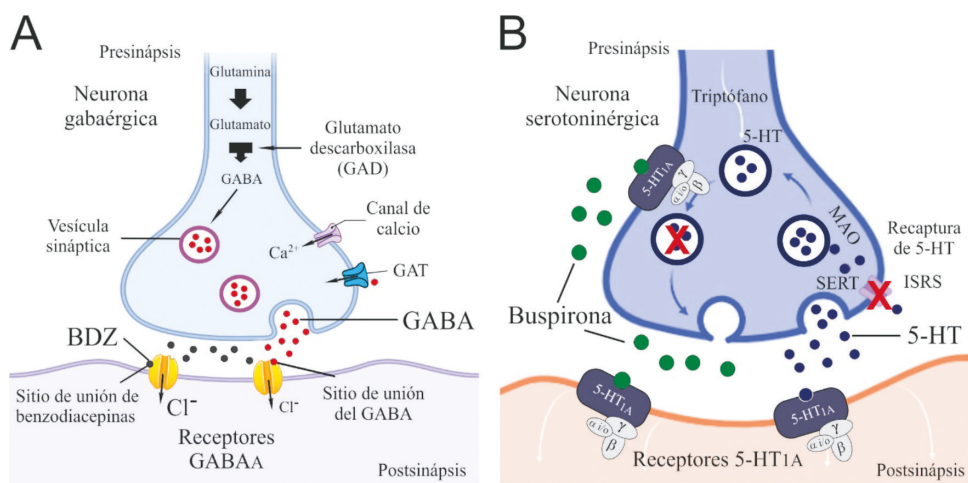


Figura 5. Mecanismos de acción de fármacos ansiolíticos. A) Aumento de la neurotransmisión GABAérgica por fármacos benzodiacepínicos. B) Mecanismo de acción de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y bupiriona para el tratamiento de la ansiedad. Abreviaciones: 5-HT, 5-hidroxi-triptamina; BDZ, benzodiacepínicos; GAT, transportador de GABA; SERT, transportador de serotonina; MAO, monoamino oxidasa; ISRS, inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. Modificado de García-García *et al.*, 2010.

parciales de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} como la bupiriona. Los ISRS como fluoxetina, citalopram y venlafaxina han mostrado eficacia en trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de angustia, fobia social y trastorno obsesivo-convulsivo, entre otros. La eficacia terapéutica a medio y largo plazo es superior a las BDZs, carecen de potencial adictivo, no producen sedación y presentan un perfil de efectos secundarios favorable. Sobre los mecanismos de acción, los ISRS provocan un aumento en los niveles de serotonina en el cerebro al bloquear su recaptura en las terminales presinápticas de neuronas serotoninérgicas (Howland, 2015). De este modo habrá más serotonina disponible para mejorar la transmisión sináptica entre las neuronas (Figura 5B).

En lo concerniente a la bupiriona, ésta se utiliza en el tratamiento de la ansiedad generalizada, parece tener efectos relativamente débiles en el trastorno de pánico y en el trastorno obsesivo-convulsivo (Howland, 2015; Lozano, 2000). La bupiriona es un agonista parcial de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, aunque también es capaz de modular a receptores dopaminérgicos presinápticos D2, D3 y D4, así como adrenérgicos alfa 1 (Riblet et al., 1982). No obstante, su efecto ansiolítico se debe fundamentalmente a su acción serotoninérgica (Lozano, 2000; Meaney et al., 2015). Se ha descrito que actúa sobre receptores presinápticos inhibidores reduciendo la liberación de serotonina y noradrenalina en el locus coeruleus (Figura 5B). A diferencia de las BDZs no produce acción hipnótica, relajante muscular y afecta mínimamente a la actividad psicomotriz.

8.3.6 Modelos experimentales de ansiedad

El uso de ratas y ratones para la investigación de las causas y tratamientos de enfermedades psiquiátricas es un desafío: los signos y síntomas de tales afecciones a menudo reflejan motivaciones, emociones y procesos cognitivos que no son atribuibles de manera realista a estas especies. Los estudios de laboratorio de ansiedad con roedores generalmente se enfocan en paradigmas de comportamiento etológicamente relevantes, particularmente para evaluar la eficacia de los medicamentos usados para tratar la ansiedad en humanos (Lezak et al., 2017). Se estima que la investigación preclínica en el área de la ansiedad utiliza cerca de 30 modelos diferentes, y aunque los hay basados en respuestas fisiológicas y en respuestas inducidas con

fármacos, la mayoría utiliza métodos conductuales de muy diversa índole (Gómez et al., 2002).

8.3.6.1 Modelo de campo abierto

La prueba de campo abierto *open-field* ha sido ampliamente utilizada para evaluar la actividad ansiolítica, la cual mide el comportamiento exploratorio y la actividad general en roedores (Gould et al., 2009). Originalmente fue descrita por Hall (1934) y la prueba consistía en medir la reacción de los roedores ante un ambiente estresante que no tenía salida. Inicialmente la prueba se realizaba en un área circular iluminada que se encontraba cerrada por una pared de 0.45 m de altura (Mora-Gallegos y Salas-Castillo, 2014). El modelo del campo abierto es ahora uno de los más populares procedimientos en los estudios de psicología animal. Actualmente se dispone de diferentes versiones, en cuanto a la forma geométrica del ambiente (circular, cuadrada o rectangular), iluminación (iluminación desde arriba con un foco sobre el campo abierto o iluminación desde abajo con una bombilla colocada bajo la superficie transparente del campo abierto, algunas veces es usada luz roja), la presencia de objetos dentro del aparato como plataformas, columnas, túneles, etc.

La prueba de campo abierto consiste en colocar a los roedores en un área determinada obligándolos a interactuar con un ambiente novedoso, esto con el fin de evaluar los efectos sedantes, tóxicos o estimulantes de los compuestos (Prut y Belzung, 2003; Gould et al., 2009). El animal se coloca en el centro o cerca de las paredes del aparato y los siguientes elementos de su comportamiento son registrados por un periodo que va de 2 a 20 minutos: locomoción horizontal (número de cruzamientos de las líneas marcadas en la superficie), actividad vertical (frecuencia de levantamientos) y si el animal defeca durante el periodo de la evaluación. En tal situación, los roedores prefieren espontáneamente la periferia del aparato a la actividad en la parte central del campo abierto. De hecho, los ratones y las ratas caminan cerca de las paredes, un comportamiento llamado tigmotaxis (Prut y Belzung, 2003; Gould et al., 2009).

Un aumento en el tiempo que los roedores pasan en la parte central del aparato sin modificación de la locomoción total o una disminución en el número de cruzamientos de las líneas marcadas en la superficie y de la

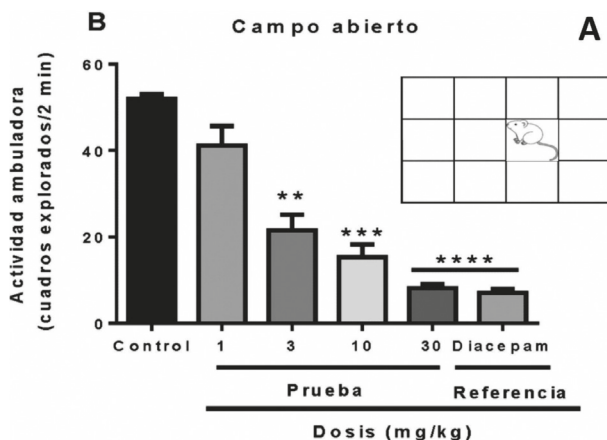


Figura 6. Modelo de campo abierto (A) y la representación en barras del efecto ansiolítico de un fármaco de prueba, en comparación con un testigo y el grupo que recibió el vehículo (B). ANADEVA seguida de la prueba *post-hoc* de Dunnett. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

actividad vertical son indicadores del efecto tranquilizante (González-Trujano *et al.*, 2006b) (Figura 6A). Un diseño experimental que ejemplifica la evaluación del efecto ansiolítico de tres dosis de un fármaco de prueba, con incremento de medio logaritmo en comparación con un control negativo (vehículo) y un positivo (testigo o fármaco referencia) se observa en la Figura 6B.

Los efectos de muchos fármacos han sido estudiados en el modelo de campo abierto. En general, los estudios muestran que el modelo es sensible a los efectos ansiolíticos producidos por BDZs clásicas y agonistas del receptor 5-HT_{1A}. Por otra parte, el modelo no muestra sensibilidad a algunos otros fármacos ansiolíticos, como son alprazolam y los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina.

8.3.6.2 Modelo del tablero con orificios

El modelo del tablero con orificios *hole-board test*, el cual fue utilizado por primera vez por Boissier y Simon (1962), ofrece una manera simple para medir la respuesta de un animal a un ambiente desconocido (Takeda *et al.*, 1998). Una de las ventajas de este modelo es que varias conductas pueden ser fácilmente observadas y cuantificadas, lo cual hace posible una

comprehensiva descripción del comportamiento de los animales. Sin embargo, al igual que en otros modelos animales para el estudio de la ansiedad, en el modelo del tablero con orificios los diversos estímulos ansiogénicos provocados por la manipulación pueden variar mucho entre los animales, lo cual puede afectar drásticamente el comportamiento de éstos.

El aparato original del modelo consistió en un tablero cuadrado con un área de 40 cm² y un grosor de 1.8 cm, perforado con 16 orificios de 3 cm de diámetro igualmente distribuidos. Un ratón es colocado en el centro del tablero. El observador registra el número de veces que el ratón introduce la cabeza en alguno de los orificios, conducta conocida como *head-dipping* (Figura 7A). Una reducción significativa en el hundimiento de la cabeza, en comparación con el grupo del vehículo se considera como una respuesta de tipo ansiolítico (Crawley, 1985; Takeda et al., 1998). De manera similar a lo observado en el campo abierto, una menor conducta de exploración de orificios se asocia con un mayor efecto ansiolítico (Figura 7B).

Diversos trabajos de investigación han estudiado el efecto de fármacos ansiolíticos utilizando el modelo del tablero con orificios. Algunos autores han reportado incrementos en la conducta de *head-dipping* después de que

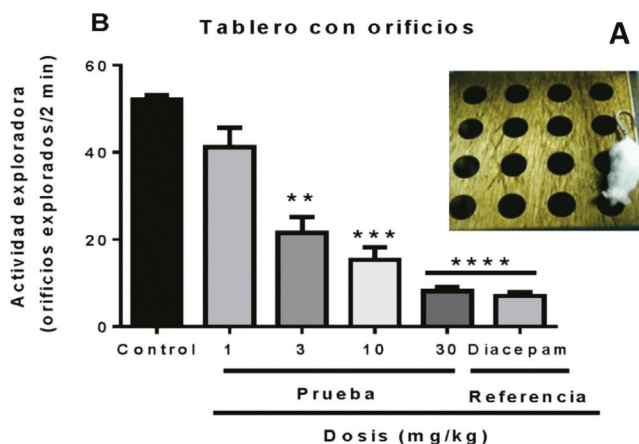


Figura 7. Modelo de ansiedad denominado tablero con orificios o *head-dipping* (A) y la representación en barras del efecto ansiolítico de un fármaco de prueba, en comparación con un testigo y el grupo que recibió el vehículo (B). ANADEVA seguida de la prueba post-hoc de Dunnett. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

los animales (ratones o ratas) fueron tratados con fármacos ansiolíticos; mientras que otros autores lo han asociado con decrementos de la misma conducta, considerándolo de la misma manera efecto ansiolítico. Dicha controversia se pudiera deber al nivel de estrés de los animales utilizados en cada estudio. Dacepam a las dosis de 0.05 – 0.5 mg/kg, i.p., promueve el aumento de *head-dipping*. Sin embargo, otro estudio probando el mismo ansiolítico en la dosis de 0.1 mg/kg, i.p., generó disminución en el *head-dipping*, cuando los animales fueron estresados previamente a la evaluación conductual.

Otro caso es el del ansiolítico clordiazepóxido, el cual mostró actividad inhibitoria cuando los animales se encontraban en un ambiente aversivo (iluminación), mientras dicho fármaco no produjo actividad en ambientes no aversivos. De tal manera que utilizar un testigo o fármaco de referencia, durante el estudio de nuevos fármacos ansiolíticos, es imperante para la toma confiable de los datos y para definir cuándo se está obteniendo un efecto ansiolítico o incluso ansiogénico.

8.3.6.3 Modelo de exploración en cilindro

Para el estudio de fármacos con actividad ansiolítica también se conoce el modelo de exploración en cilindro (Figura 8A). Éste permite medir la actividad vertical de roedores previamente administrados con un determinado fármaco ansiolítico, y se basa en que una disminución en el número de levantamientos espontáneos realizados por el roedor sobre sus extremidades posteriores implica un efecto ansiolítico (Figura 8B).

8.3.6.4 Modelo de cruz elevada o *plus-maze*

El laberinto en cruz elevado o *plus-maze* es reconocido como uno de los modelos experimentales de ansiedad más utilizados para bioensayo de fármacos ansiolíticos. Este modelo es comúnmente utilizado por la industria farmacéutica como herramienta de detección de compuestos con potencial ansiolítico, y se basa en la libre exploración de los roedores frente a un ambiente novedoso, permite elegir entre dos pares de zonas distintas: un par de brazos abiertos (área de riesgo) y un par de brazos cerrados (área segura) (Figura 9A). Por tanto, el comportamiento exploratorio normal de los roedores es generalmente concentrado en los brazos cerrados. La administración de

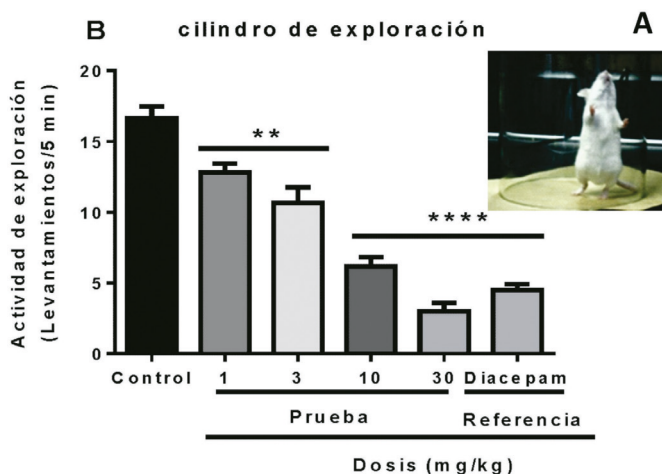


Figura 8. Modelo de ansiedad denominado exploración en cilindro, donde se realiza el conteo de levantamientos o *rearings* (A), y la representación en barras del efecto ansiolítico de un fármaco de prueba, en comparación con un testigo y el grupo que recibió el vehículo (B). ANADEVA seguida de la prueba *post-hoc* de Dunnett. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

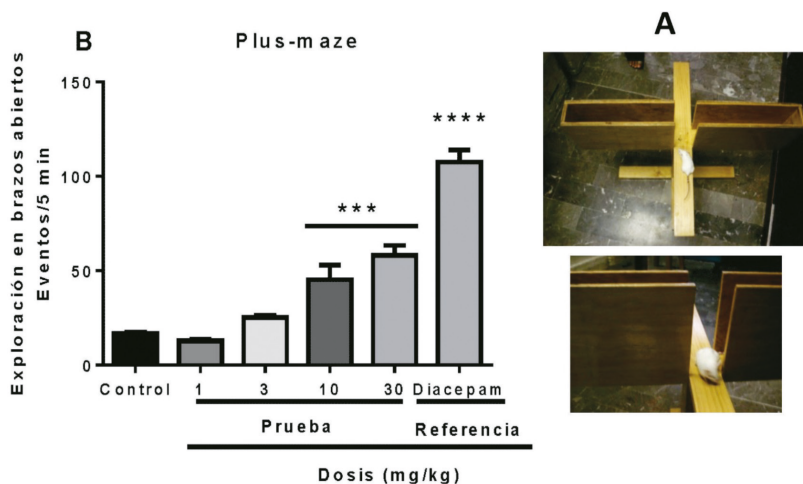


Figura 9. Modelo de ansiedad denominado cruz elevada o *plus-maze* (A) y la representación en barras del efecto ansiolítico de un fármaco de prueba, en comparación con un testigo y el grupo que recibió el vehículo (B). ANADEVA seguida de la prueba *post-hoc* de Dunnett. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

compuestos que provocan ansiedad conduce a una disminución del tiempo de permanencia en áreas abiertas, mientras que los compuestos ansiolíticos tienden a reducir la aversión a lo abierto y aumentar el tiempo exploratorio que pasan en los brazos abiertos (Lister, 1987; Walf y Frye, 2007) (Figura 9B).

8.3.7 Búsqueda de compuestos bioactivos con actividad ansiolítica

A pesar de la existencia de una gran diversidad biológica de especies vegetales medicinales y saberes tradicionales en México y en diversas partes del mundo, donde ya se hace uso de este recurso en la atención clínica, pocas han sido evaluadas para la búsqueda de compuesto bioactivos. Por tanto, la medicina tradicional proporciona una base útil para el desarrollo de nuevos candidatos a fármacos, y se considera una opción de tratamiento atractiva para pacientes que no responden adecuadamente a los fármacos sintéticos (Fedotova et al., 2017; Savage et al., 2018).

Algunas especies de plantas con efectos ansiolíticos que han sido evaluadas tanto como extractos crudos, fracciones bioactivas e incluso sus compuestos activos puros son: *Piper methysticum* (kava), *Centella asiatica* (centella), *Humulus lupulus* (lúpulo), *Ginkgo biloba* (cabello de doncella), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Melissa officinalis* (melisa), *Passiflora incarnata* (maypop), *Scutellaria leuciflora* (escutelaria), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Withania somnifera* (ashwagandha), *Magnolia officinalis* (corteza de magnolia) y *Lavendula angustifolia* (lavanda) (Sarris et al., 2013; Savage et al., 2018; Sartori y Singewald, 2019), *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Oliva et al., 2004), *Tagetes lucida* L. (Pérez-Ortega et al., 2016), *Tilia americana* var. *mexicana* (Pérez-Ortega et al., 2008), entre otras.

Los resultados de estudios experimentales han demostrado que compuestos bioactivos de estas plantas de naturaleza alcaloide, terpeno, flavonoide, ácidos fenólicos, lignano, cinamatos y saponinas, producen efectos ansiolíticos en una amplia gama de modelos animales de ansiedad (Fedotova et al., 2017). Además han permitido establecer algunos de sus mecanismos de acción, que involucran la interacción con los receptores GABA_A, ya sea a través de la unión directa al receptor o la modulación de la membrana celular o del canal iónico, inhibición de la transaminasa GABA o de la descarboxilasa del ácido glutámico; una variedad de efectos monoaminérgicos

y la posible modulación de los receptores de tipo cannabinoide (Fedotova et al., 2017; Savage et al., 2018; Sartori y Singewald, 2019). Cabe señalar que, a pesar de los avances alcanzados hasta ahora, los mecanismos de acción del efecto ansiolítico de los productos naturales son complejos y requieren de investigación adicional en el futuro.

8.4 Epilepsia

La epilepsia se define como un trastorno cerebral caracterizado por una permanente predisposición a presentar crisis epilépticas con las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicosociales y sociales que genera esta afección. Crisis epiléptica es por tanto la ocurrencia transitoria de signos y/o síntomas debidos a una excesiva actividad o sincronización neuronal en el cerebro (Fisher et al., 2017).

La actividad neuronal característica en la epilepsia es consecuencia de descargas eléctricas de un grupo de neuronas, en lugares específicos del cerebro denominados foco primario. Desde el punto de vista anatómico, esta región tiene un aspecto por completo normal. Casi nunca hay causa identificable de la epilepsia, aunque ciertas áreas sufren alteraciones funcionales que pueden demostrarse mediante el desencadenamiento de la actividad epileptógena o paroxística con diferentes factores ambientales, como la modificación de los gases en la sangre, pH, electrolitos o disponibilidad de glucosa. Es así que la ocurrencia de al menos una crisis debe ser corroborada mediante el análisis de EEG.

8.4.1 Epidemiología

La proporción estimada de la población mundial con epilepsia activa (es decir, crisis convulsivas continuas o necesidad de tratamiento) se encuentra entre 4 a 10/1000 personas. Sin embargo, algunos estudios en países en desarrollo sugieren que la proporción se encuentra entre 6 a 10/1000 personas. Alrededor de 50 millones de personas en el mundo sufren epilepsia. En países desarrollados la tasa de nuevos casos anuales se encuentra entre 40 a 70/1000 personas en la población general. Cerca del 90 % de los casos de epilepsia en el mundo son encontrados en regiones en desarrollo (Reséndiz-Aparicio, 2013). Alrededor del 70 % de los pacientes que padecen tras-

tornos epilépticos responden favorablemente al tratamiento, sin embargo, se estima que tres cuartas partes de las personas afectadas en los países en desarrollo no reciben el tratamiento que necesitan.

8.4.2 Síntomas

Las personas epilépticas presentan manifestaciones clínicas variadas, con una amplia gama de síntomas que la mayoría de las veces son referidos por el paciente o algún miembro de la familia. La fase premonitoria incluye los llamados factores precipitantes o facilitadores, tales como fiebre, enfermedad, altitudes, falta de sueño, disminución del umbral, menstruación, lesión cerebral. Es de señalar que este estado puede incluir síntomas algo controvertidos, usualmente relacionados con el último evento que, junto con el tiempo de duración —desde algunos minutos, horas o aun en algunos casos hasta días—, deben aprender a reconocerse como síntomas prodrómicos y no como inicio de crisis (Palacios y Clavijo-Prado, 2016). El aura es una sensación o fenómeno particular que precede a un ataque de epilepsia y puede ser de diferente tipo. Durante la crisis, la sintomatología es usualmente relacionada con la alteración de la conciencia. Sin embargo, existen las crisis parciales simples que pueden no asociarse con pérdida de la conciencia, por lo que se considera el compromiso cerebral con manifestaciones motoras, sensitivomotoras o psíquicas.

8.4.3 Diagnóstico

El EEG y los estudios de neuroimagen sirven para sustentar una etiología y el pronóstico, así como para influir en la selección de un manejo médico o quirúrgico. Para el diagnóstico de la epilepsia existen pruebas habituales, tales como: la tomografía computarizada (TC): es una técnica que visualiza el cráneo y las estructuras intracerebrales a través de rayos X, por lo general después de una primera crisis epiléptica. La TC ha demostrado gran efectividad para detectar en una primera valoración la presencia de tumores, lesiones hemorrágicas y/o isquémicas, y otras lesiones estructurales que puedan justificar una primera crisis a valorar de forma urgente. La resonancia magnética (RM) cerebral es otra técnica de neuroimagen de elección en casos de epilepsia atendidos en la consulta especializada. Permite identi-

car alteraciones estructurales responsables o relacionadas con el origen de las crisis epilépticas.

Finalmente, el EEG es una prueba realizada con la colocación de electrodos de superficie (a través de un gorro especial), que registran la actividad bioeléctrica cerebral amplificada. El EEG estándar se realiza con el paciente en reposo y suele acompañarse de estimulación luminosa intermitente e hiperventilación, cuando no está contraindicada, así como de la apertura y cierre ocular. El EEG puede mostrar alteraciones bruscas (paroxísticas) de la actividad eléctrica del cerebro, que son típicas de la epilepsia (anomalías epileptiformes) (Fraire-Martínez, 2013). Es una prueba de gran ayuda en el diagnóstico inicial de la epilepsia, ya que si encontramos alteraciones típicas ayudan al diagnóstico sindrómico y a clasificar el tipo de crisis (por ejemplo: epilepsia generalizada con punta-onda a 3 Hz, actividad focal, etc.).

8.4.4 Clasificación

La clasificación en epilepsia data al menos de los tiempos de Hipócrates, pero Gastaut ostenta el mérito de proponer la primera clasificación moderna en el año de 1969. Un intenso debate y la adquisición de nuevos conocimientos en las siguientes dos décadas condujeron a la clasificación de 1985, y subsecuentemente a una versión ratificada por la asamblea general de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés, International League Against Epilepsy) en 1989, la cual ha tenido una gran influencia mundial y un impacto mayor en la investigación y en el cuidado de pacientes. Aunque la investigación moderna ha mostrado que la epilepsia es una enfermedad de redes neuronales, más que un síntoma de anormalidades locales del cerebro, y a pesar de que el conocimiento de las redes crece rápidamente, éste aún no es suficiente para fungir como base para una clasificación rigurosamente científica de las crisis. Por tanto, las propuestas actuales están basadas en los últimos entendimientos científicos, acompañados por la opinión de expertos y profesionales en epilepsia de la comunidad mundial.

La clasificación clínica de la epilepsia distingue dos categorías: parciales y generalizadas, aunque con algunas superposiciones y muchas variantes

en cada una de ellas. Las dos formas se dividen a su vez en simples (sin pérdida de conciencia) y complejas (con pérdida de conciencia).

8.4.4.1 Crisis focales

Las crisis parciales son aquellas en las que las descargas comienzan de forma local y, a menudo, así permanecen. Los síntomas dependen de las regiones encefálicas afectadas y consisten en contracciones musculares involuntarias, experiencias sensitivas o descargas autónomas anormales o efectos sobre el estado de ánimo y el comportamiento, por lo que con frecuencia de habla de epilepsia psicomotora. En este tipo de epilepsia, la descarga EEG suele limitarse a un solo hemisferio. Las crisis focales a menudo se atribuyen a lesiones cerebrales locales y su incidencia aumenta con la edad.

8.4.4.2 Crisis generalizadas

Las crisis generalizadas afectan a todo el encéfalo, incluido el sistema reticular, con una actividad eléctrica anormal de los dos hemisferios. Se caracteriza por una pérdida inmediata de la conciencia. Existen dos grupos importantes, las crisis tónico-clónicas y las ausencias. La crisis tónico-clónica consiste en una fuerte contracción inicial de la totalidad de la musculatura que produce un espasmo rígido en extensión. La respiración se detiene a menudo y el paciente defeca, orina o segrega gran cantidad de saliva. Esta fase tónica dura alrededor de un minuto, tras lo cual aparece una serie de sacudidas violentas y sincrónicas que van cediendo de forma gradual en 2-4 minutos.

En los niños aparecen crisis de ausencia, que son mucho menos exageradas, pero que surgen con más frecuencia (muchos episodios cada día) que las crisis tónico-clónicas. El paciente interrumpe bruscamente la actividad que está llevando a cabo, a veces deja de hablar en medio de una frase, y permanece ausente durante algunos segundos, pero con escasas o nulas alteraciones motrices. No es juicioso de lo que lo rodea y se recupera de manera brusca sin efectos posteriores.

La clasificación publicada en 2017 por la ILAE se basa en tres distintos niveles de diagnóstico, pensada así para servir de la mejor forma en función de los recursos e información disponibles en el entorno clínico, permitiendo

Tabla 4. Clasificación operacional extendida de los tipos de crisis, ILAE 2017.

Tipos de crisis		
Inicio focal	Inicio generalizado	Inicio desconocido
Conciencia preservada Conciencia alterada Inicio motor - Automatismos - Atónica - Clónica - Espasmo epiléptico - Hiperquinética - Mioclónica - Tónica Inicio no motor - Autonómica - Detención del comportamiento - Cognitiva - Emocional - Sensorial Focal a bilateral Tónico-clónica	Motor - Tónico-clónica - Clónica - Tónica - Mioclónica - Mioclónica-atónica-clónica - Mioclónica-atónica - Atónica - Espasmo epiléptico No motor (ausencia) - Típica - Atípica - Mioclónica - Mioclónica palpebral	Motor - Tónico-clónica - Otro motor No motor - Detención del comportamiento No clasificadas

una clasificación multinivel y, de ser posible, recomendando un diagnóstico en cada uno de ellos (Fisher et al., 2017) (Tabla 4).

En el primer nivel solo es posible determinar el tipo de crisis, dado que podría no haber acceso a estudios de EEG, video o imagenología, o la información puede ser limitada como para realizar un diagnóstico mayor. Aquí se distinguen tres grandes grupos: crisis de inicio focal, ya sean unifocales o multifocales, así como convulsiones en un solo hemisferio; crisis de inicio generalizado que involucran a ambos hemisferios; y crisis de inicio desconocido, en las cuales el clínico es incapaz de determinar si su inicio es focal o generalizado. En este nivel se toma en consideración la presencia o

ausencia de signos motores, y en el caso de crisis focales es posible hacer una mayor distinción, de acuerdo con el nivel de conciencia de la persona durante la crisis.

El segundo nivel de clasificación se basa en el tipo de epilepsia e incluye a la epilepsia focal, epilepsia generalizada, epilepsia combinada (presencia de crisis focales y generalizadas, como en los síndromes de Dravet y Lennox-Gastaut) y epilepsia de inicio desconocido. Muchas epilepsias pueden incluir múltiples tipos de crisis y el diagnóstico a este nivel suele realizarse sobre una base clínica, apoyándose en evidencia electroencefalográfica de periodos ictales e interictales.

El tercer nivel es un diagnóstico del síndrome epiléptico y es posible realizarlo, cuando además del tipo de crisis se posee información sobre estudios EEG y de imagenología, etiología, edad de inicio y remisión (si procede), desencadenantes de las crisis, variaciones durante ciclos circadianos, severidad y pronóstico. Existen muchos síndromes bien reconocidos, como la epilepsia infantil de ausencia o el síndrome de West.

8.4.5 Terapéutica

La posibilidad de una clasificación de la epilepsia es fundamentalmente una herramienta clínica, para evaluar a los individuos que se presentan con crisis en un servicio de salud, aunque su utilidad e impacto se extiende tanto a los dominios de la investigación clínica y básica como al desarrollo de nuevas terapias. La clasificación provee un marco de referencia para entender el tipo de crisis que el paciente presenta, qué otra podría presentar, los posibles desencadenantes de éstas y a menudo su prognosis, así como el riesgo de comorbilidades y mortalidad; por último, pero no menos importante, guía la selección de posibles terapias.

Los fármacos antiepilépticos más frecuentemente usados y su mecanismo de acción son resumidos en la Tabla 5 y Figura 10.

8.4.6 Modelos experimentales de crisis convulsivas y epilepsia

Los modelos animales de la epilepsia han jugado un rol fundamental en la comprensión de los cambios fisiológicos y anatómicos asociados a la epilepsia en el humano, asimismo, desde la primera mitad del siglo xx han

Tabla 5. Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos.

Agente antiepiléptico	Mecanismo(s) de acción
Benzodiacepinas	Mejoran la acción del GABA. Reducen sostenidamente ataques repetitivos.
Carbamazepina	Bloquea canales de sodio voltaje-dependientes.
Etosuximida	Reduce corrientes de Ca^{2+} tipo T
Felbamato	Inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica (reduce la acción del NMDA, bloquea el sitio de unión a glicina en el receptor de NMDA).
Fenitoína	Bloquea canales de Na^+ voltaje-dependientes. Reduce corrientes de Ca^{2+} .
Gabapentina	Análogo del GABA pero no actúa sobre los receptores GABAérgicos ni se convierte o metaboliza en GABA. Incrementa las sinapsis GABAérgicas: ¿activación de GAD? Puede bloquear el transporte de los aminoácidos. Se une a canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes reduciendo la concentración de Ca^{2+} intraneuronal.
Lamotrigina	Reduce la liberación de glutamato. Inhibe las corrientes de Ca^{2+} voltaje-dependientes, bloquea canales de Na^+ voltaje-dependientes.
Levetiracetam	Reduce la liberación de Ca^{2+} intraneuronal y se une a la proteína 2A de las vesículas sinápticas.
Oxcarbazepina	Inhibición de canales de Na^+ voltaje-dependientes. Inhibición de corrientes de Ca^{2+} voltaje-activadas.
Pentobarbital	Mejora la acción del GABA. Reduce corrientes de Ca^{2+} voltaje-dependientes.
Primidona	Bloquea corrientes de Na^+ voltaje-dependientes.
Progabida	Agonista de los receptores GABA-A y GABA-B.
Remacemida	Antagonista del receptor NMDA. Inactivación de los canales de Na^+ .
Tiagabina	Inhibidor de la recaptura neuronal del GABA.
Topiramato	Bloquea los canales de Na^+ . Reducción de las corrientes de Ca^{2+} tipo L. Potenciación del GABA en el receptor GABA-A: aumento del flujo de CT. Inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica: bloqueo de los receptores AMP A/kainato. Inhibición de la anhidrasa carbónica.

Tabla 5. Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos (continuación).

Agente antiepiléptico	Mecanismo(s) de acción
Valproato	Incrementa la síntesis y reduce el catabolismo del GABA. Bloquea las corrientes de Ca^{2+} tipo T. Aumenta la inactivación de los canales de Na^+ .
Vigabatrina	Inhibidor de la GABA-transaminasa. Inhibe la recaptura del GABA.
Zonisamida	Bloquea los canales de Na^+ . Bloquea canales de Ca^{2+} tipo T. Mejora la acción de GABA. Inhibe la anhidrasa carbónica.
Retigabina	Modulador alostérico positivo de canales iónicos de potasio KCNQ. Estabiliza el potencial de membrana y controlar la excitabilidad neuronal.
Perampanel	Antagonista no competitivo y selectivo de los receptores AMP A en las neuronas postsinápticas. Inhibe la respuesta excitatoria rápida en la neurotransmisión

contribuido al desarrollo de fármacos antiepilépticos, muchos de los cuales aún son prescritos hoy en día. Dichos modelos se realizan en numerosas especies de animales, desde la *Drosophila melanogaster* hasta primates no humanos, y son lo suficientemente diversos como para permitir estudiar la plétora de aspectos relevantes asociados con esta enfermedad (Pitkänen et al., 2017).

En epilepsia existen modelos agudos y crónicos. Los agudos se inducen por la administración de fármacos convulsivantes, como el pentilentetrazol (PTZ), la bicuculina, la 4-aminopiridina, etc. (Velíšková et al., 2017), o por estimulación eléctrica (Van Vliet y Gorter, 2017). Los modelos crónicos consisten en lesiones térmicas o por hipoxia, lesiones traumáticas, activación optogénica, creación de cepas de roedores susceptibles a presentar crisis (modelos transgénicos) y el uso de animales que poseen como rasgo hereditario la capacidad de presentar crisis epilépticas (Pitkänen et al., 2017). Ambos tipos de modelos reproducen crisis parciales y generalizadas; sin embargo, dado que la epilepsia se caracteriza por la aparición de crisis recurrentes a lo largo del tiempo, sólo los modelos que reproducen esa condición se consideran modelos de epilepsia (García-García et al., 2010; Pitkänen et al., 2017).

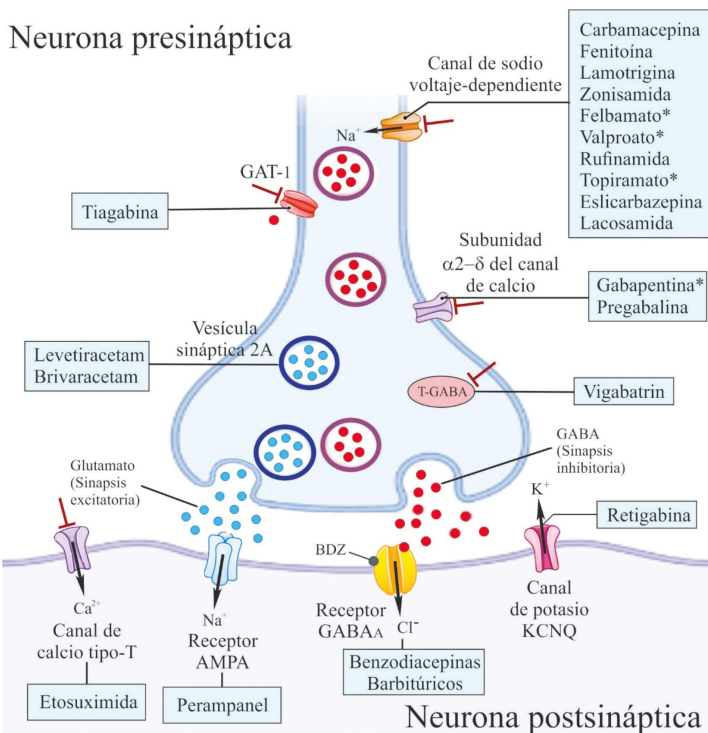


Figura 10. Representación simplificada de los blancos moleculares de los fármacos antiepilépticos en la sinapsis. Abreviaciones: BDZ, benzodiacepinas; GABA-T; ácido gamma-aminobutírico transaminasa; GAT-1; transportador GABA 1; *múltiples mecanismos de acción. Modificada de García-García et al., 2010.

El repasar todos y cada uno de los modelos es una tarea por demás extenuante, por lo que conviene resumir las ventajas y desventajas de las distintas categorías en que se agrupan: aquellos dependientes de fármacos permiten la rápida generación de crisis y la investigación de mecanismos epileptógenos, también han sido utilizados en gran medida en el “screening” de fármacos antiepilépticos, todo esto a expensas de una alta tasa de mortalidad de los sujetos experimentales y gran variabilidad en la frecuencia y severidad de las crisis espontáneas. En contraste, los protocolos de estimulación eléctrica suponen un menor riesgo para los sujetos experimentales y facilitan el control de las crisis y su progresión, llegando a ser costosos y a requerir bastante tiempo para ser llevados a término.

Por otra parte, las lesiones térmicas, por hipoxia o traumáticas suelen aproximarse en mayor medida a las condiciones etiológicas de ciertos síndromes, pero las inconsistencias dependientes del procedimiento experimental minan la posibilidad de realizar comparaciones significativas entre animales y humanos. Finalmente, las cepas genéticamente susceptibles a presentar crisis eliminan mucho de la artificialidad de las manipulaciones en los procedimientos experimentales, pero las alteraciones genéticas precisas no siempre son conocidas, además de que ciertos estímulos sensoriales desencadenantes aún son requeridos (Kandratavicius et al., 2014).

8.4.6.1 Pentilentetrazol (PTZ)

Entre los modelos dependientes de un agente quimioconvulsivante, la administración de PTZ es bien conocida por inducir crisis generalizadas. En dosis bajas (20-40 mg/kg) se ha utilizado como un modelo de crisis de ausencia y en dosis mayores (50-90 mg/kg) es capaz de generar crisis convulsivas clónicas y tónico-clónicas, así como estado epiléptico; junto con el modelo de electroshock máximo, es uno de los modelos más utilizados para valorar la eficacia de fármacos antiepilépticos (Coles et al., 2017; Velíšková et al., 2017).

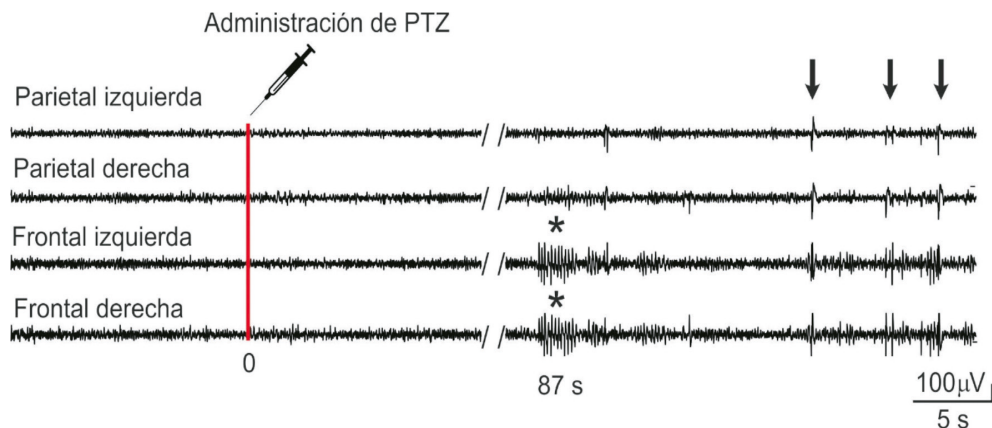


Figura 11. EEG representativo de la actividad eléctrica en áreas corticales (frontal y parietal) de ratones tratados con PTZ (85 mg/kg, i.p.). Las descargas espiga-onda (señaladas con asteriscos) y las espigas epilépticas (indicadas con flechas) evolucionan hasta generar crisis convulsivas generalizadas o tónico-clónicas (ver Figura 12).

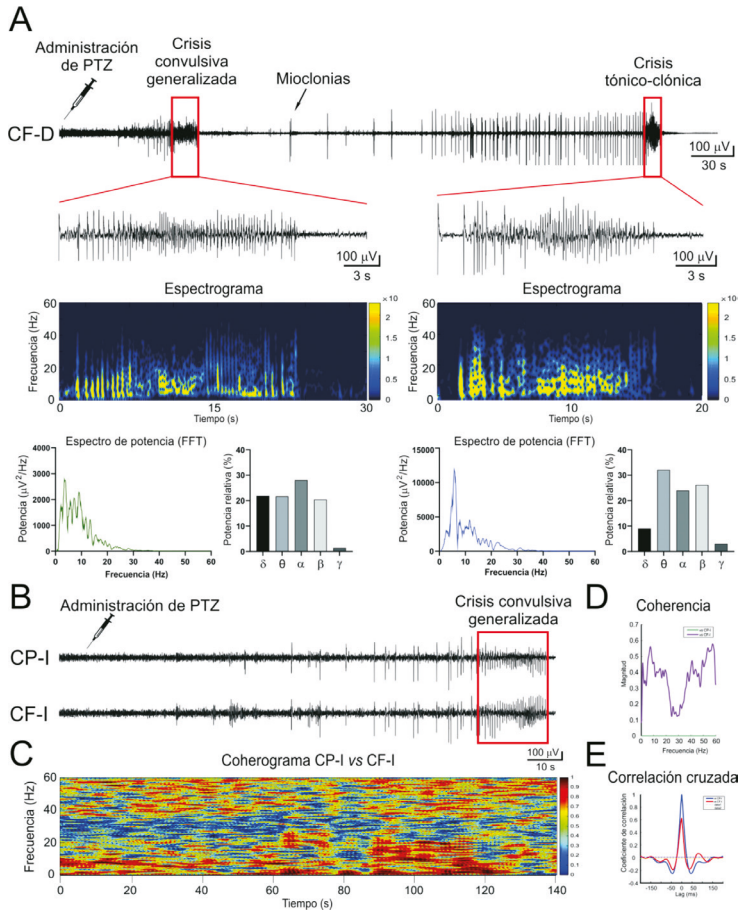


Figura 12. Análisis espectral, de coherencia y correlación cruzada en las crisis inducidas con PTZ en el ratón. EEG representativo de la actividad eléctrica registrada en la corteza frontal derecha, después de inyectar PTZ (85 mg/kg, i.p.) (A). Nótese el aumento en la amplitud y la frecuencia de las espigas asociado a la severidad de la convulsión, ya sea una crisis generalizada o una tónico-clónica. Además, se muestran sus respectivos espectrogramas, espectros de potencia y valores de la potencia relativa en las bandas de frecuencia δ (0.5-4 Hz), θ (4.5-7.5 Hz), α (8-13 Hz), β (13-30 Hz) y γ (30-60 Hz). Evolución de una crisis generalizada registrada en la corteza parietal y frontal del hemisferio izquierdo (B). El coherograma de ambos registros indica la evolución de la crisis en el dominio del tiempo y la frecuencia entre ambas zonas de registro (C). A la derecha se presenta el resultado de la conectividad funcional entre ambos sitios de registro, obtenido por medio de un análisis de coherencia y correlación cruzada (D y E, respectivamente). Nota: En los espectrogramas y el coherograma, la escala de colores (izquierda) indica la potencia o el nivel de conectividad, donde los colores cálidos son los de mayor potencia o conectividad y los fríos son los valores de menor magnitud. Abreviaciones: CF-D, corteza frontal derecha; CF-I, corteza frontal izquierda; CP-I, corteza parietal izquierda; FFT, transformada rápida de Fourier; PTZ, pentilentetrazol.

El PTZ es un derivado tetrazol con una consistente acción convulsiva en ratones, ratas y primates. Cuando es administrado por vía parenteral, el PTZ inicialmente produce conducta convulsiva identificada como mioclonias, posteriormente puede conducir a crisis generalizadas o tónico-clónicas, que pueden ser identificadas y caracterizadas conductualmente y por medio del EEG (Figuras 11 y 12).

Las crisis generalizadas se caracterizan como espasmos musculares que afectan a las extremidades anteriores, con o sin pérdida del reflejo de en-derezamiento. Las crisis tónico-clónicas generalizadas se caracterizan por una ventroflexión inicial, seguida de extensión completa de las extremidades anteriores y posteriores. Por lo anterior, la administración de PTZ se considera un modelo idóneo para el estudio de crisis tónico-clónicas generalizadas. Por su bajo costo y su fácil manejo, el modelo de PTZ ha sido ampliamente usado en la investigación clínica y en el desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos. La evaluación consiste en observar a los animales por 30 minutos, durante los cuales se cuantifica la incidencia, latencia y duración de las crisis generalizadas y las crisis tónico-clónicas, así como la tasa de mortalidad. Cuando se cuenta con un registro EEG, es posible discriminar la morfología de la actividad epileptiforme y cuantificar el número de espigas epilépticas. La severidad de las crisis se mide siguiendo la escala de Lüttjohann et al. (2009).

Actualmente, la tecnología y la ingeniería hacen uso de métodos y modelos matemáticos para el análisis conductual asociado a la actividad EEG. Un ejemplo de ello es la transformada rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés), con la cual es posible realizar análisis espectral de las señales registradas en el EEG. Con ello se pueden conocerlas frecuencias dominantes y los cambios en la amplitud o potencia de una crisis (Figura 12A). Asimismo, con este método es posible establecer la evolución de una crisis en el dominio del tiempo-frecuencia, y la conectividad funcional entre dos o más regiones del cerebro usando el análisis de coherencia o correlación cruzada, entre otros (Figura 12B).

Los modelos animales con PTZ se adoptaron como pruebas de detección de fármacos antiepilepticos, lo cual en parte se debió a que el agente anticonvulsivo etosuximida no alteró los umbrales convulsivos en el modelo

de electrochoque máximo. En contraste, algunos fármacos efectivos contra crisis inducidas mediante el modelo de electrochoque máximo, tales como fenitoína y carbamazepina, son inefectivos contra las crisis inducidas con PTZ. Por otra parte, algunos fármacos como pentobarbital, ácido valproico y diazepam responden efectivamente contra las crisis inducidas por ambos modelos.

Aunque los modelos animales basados en las crisis agudas y umbral de las crisis inducidas con PTZ son ampliamente usados para la búsqueda de nuevos fármacos, así como su toxicidad (González-Trujano *et al.*, 2021, 2022). El mecanismo por el cual el PTZ actúa no es del todo entendido. Sin embargo, generalmente se acepta que actúa como antagonista del sitio de unión alostérico del receptor GABA_A, como lo hace la picrotoxina (Velíšková *et al.*, 2017). No obstante, estudios recientes indican que el PTZ y la picrotoxina interactúan con distintos dominios del receptor GABA_A. Donde el PTZ reduce principalmente la conductancia del ión Cl⁻ y, en menor medida, las de los iones K⁺ y Na⁺ generando actividad de tipo paroxístico o descargas espiga-onda y poliespigas observadas en el EEG (Figura 11).

8.4.6.2 Modelo de electrochoque máximo

La prueba de electrochoque máximo consiste en aplicar un estímulo eléctrico máximo capaz de generar crisis tónico-clónicas. En la prueba de electrochoque máximo, un choque de corriente alterna de 60 Hz y 50 mA (en ratones) ó 150 mA (en ratas) es administrada a través de electrodos localizados en la córnea por 0.2 segundos. El objetivo es verificar la eficacia de determinado agente en abolir la extensión tónica de los miembros posteriores. Clínicamente, los fármacos que presentan esta propiedad son eficaces en prevenir las crisis parciales y tónico-clónicas generalizadas (Van Vliet y Gorter, 2017). Representa un modelo de crisis agudas sensibles a compuestos que actúan modulando la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje, como la fenitoína (García-García *et al.*, 2010; Van Vliet y Gorter, 2017), donde se evalúan como parámetros la incidencia y/o duración de la extensión tónica.

8.4.6.3 Kindling

El *kindling* es un modelo crónico de epilepsia utilizado para estudiar el proceso de la epileptogénesis y para el descubrimiento de nuevos compuestos antiepilépticos. Este modelo es también conocido como encendimiento y consiste en la estimulación repetida, ya sea eléctrica o química, de diversas estructuras del sistema límbico (mayor reactividad encontrada en áreas cerebrales como la amígdala, corteza e hipocampo), de tal manera que se va generando una propagación de la excitabilidad de las neuronas, a partir de un foco epiléptico que eventualmente llevará a la generalización y la participación de los dos hemisferios, provocando la manifestación de crisis espontáneas con la instalación gradual de la actividad paroxística (Goddard *et al.*, 1969).

La progresión de la epileptogénesis producida por el *kindling* es gradual y se distingue por la presencia de una serie de etapas que van de 0 a 5, establecidas por Racine en 1972. Cuando los animales presentan la etapa 5, las crisis ya son permanentes y se considera que se ha alcanzado el estado *kindled*. La progresión escalonada del encendimiento se calcula con el número de estímulos requeridos para que alcancen y permanezcan en cada etapa, también es común evaluar la duración de las postdescargas y la frecuencia de espigas. Cuando un fármaco es capaz de retardar o inhibir la progresión del *kindling* se considera como potencial antiepileptógeno o antiepiléptico.

En general existen una gran variedad de modelos, incluidos los genéticamente epileptógenos, donde se encuentran animales que poseen como rasgo hereditario la capacidad de presentar crisis epilépticas. En la actualidad, con la finalidad de aplicar la norma de las 3R's, el pez cebra (*Danio rerio*) se está considerando una de las opciones óptimas como recurso académico y científico en la evaluación de sustancias bioactivas, ello debido a sus características y ventajas de alta tasa de fertilidad, reproducción y fertilización con un desarrollo rápido (Bertoncello y Bonan, 2021).

8.4.7 Estudios farmacológicos para la obtención de compuestos bioactivos anticonvulsivos y/o antiepilépticos

Una fuente prometedora de nuevas sustancias anticonvulsivas y/o antiepilépticas seguras y eficaces son las plantas medicinales, las cuales además representan la posibilidad de tratamientos económicos y culturalmente

aceptables para los millones de personas con epilepsia en México y en el mundo (Schachter, 2009; Sucher y Carles, 2015; Xiao *et al.*, 2015). El potencial terapéutico de las plantas medicinales y sus compuestos bioactivos con actividad anticonvulsiva han sido objeto de extensa investigación (He *et al.*, 2021), la cual ha derivado en el estudio de 280 especies de hierbas provenientes de 216 géneros y 93 familias (Sucher y Carles, 2015).

De manera general, los estudios farmacológicos comprenden a los extractos crudos, fracciones o compuestos individuales obtenidos de dichas plantas medicinales. Los modelos de crisis convulsivas más utilizados son en su mayoría los inducidos con el modelo de electrochoque máximo y sustancias químicas tales como PTZ, picrotoxina, bicuculina, estricnina, penicilina, entre otros, y en menor proporción el modelo de *kindling* químico o eléctrico (Sucher y Carles, 2015; Manchishi, 2018).

A pesar del creciente número de investigaciones con plantas medicinales, los constituyentes reportados como responsables de la actividad anticonvulsiva y/o antiepiléptica son variados y se han identificado de diferente naturaleza química, tales como alcaloides, flavonoides, sacáridos, glucósidos, quinonas, cumarinas, lignanos, terpenos, aceites volátiles, saponinas y glucósidos cardíacos (Kim, 2016). Los mecanismos terapéuticos de estos efectos incluyen la regulación de la sinapsis y vías del receptor (GABA, Glutamato, NMDA y 5-HT), canales iónicos (Ca^{2+} , K^{+} y Na^{+}), sistema inmune (CD3, CD4, IgG, IgA, TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10), glial (proliferación de células gliales y capacidad de absorción de potasio) y disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (marcadores de oxidación, acumulación de Ca^{2+} , muerte celular y apoptosis) (He *et al.*, 2021).

Pocos estudios de investigación de extractos, fracciones o compuestos puros incluyen el análisis EEG, el cual se considera el estándar de oro para el diagnóstico de la epilepsia, algunos ejemplos en nuestra experiencia son extractos y/o compuestos de *Annona diversifolia* Saff., *Valeriana edulis* L., *Justicia spicigera* L., *Ruta chalepensis* L., *Tabernaemontana arborea* (González-Trujano *et al.*, 2006a,b; 2017; 2021a,b; 2022). Cabe hacer mención que los medicamentos a base de hierbas en dosis altas son generalmente bien tolerados, y producen menos efectos adversos en comparación con los fármacos antiepilépticos sintéticos (González-Trujano *et al.*, 2016, 2021, 2022).

Conclusión

El objetivo de este capítulo es integrar de manera concreta información sobre enfermedades del sistema nervioso central, enfatizando la utilidad de los modelos experimentales en la investigación y búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del insomnio, la ansiedad y la epilepsia.

Referencias

- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Cuarta edición. American Psychiatric Press, Washington D. C.
- Ancoli-Israel, S. y Roth, T. (1999). Characteristics of insomnia in the United States: results of the 1991 National Sleep Foundation Survey. I. *Sleep*, 22 (Supl. 2): S347-S353.
- Anderson, K. N. y Bradley, A. J. (2013). Sleep disturbance in mental health problems and neurodegenerative disease. *Nature and Science of Sleep*, 5: 61-75. <https://doi.org/10.2147/NSS.S34842>.
- Ashton, H. (1994). Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs*, 48(1): 25-40. Doi: 10.2165/00003495-199448010-00004.
- Bertoncello, K. T. y Bonan, C. D. (2021). Zebrafish as a tool for the discovery of anticonvulsant compounds from botanical constituents. *European Journal of Pharmacology*, 908: 174342. (<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174342>).
- Boissier, J. R. y Simon, P. (1962). La réaction d'exploration chez la souris. *Thérapie*, 17: 1225-1232.
- Borrás, S., Martínez-Solís, I., Ríos, J. L. (2021). Medicinal plants for insomnia related to anxiety: An updated review. *Planta Med.*, 87(10-11): 738-753. (<https://doi.org/10.1055/a-1510-9826>).
- Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., McCarley, R. W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, 92(3): 1087-1187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2011>.
- Bruni, O., Ferini-Strambi, L., Giacomoni, E., Pellegrino, P. (2021). Herbal remedies and their possible effect on the GABAergic system and sleep. *Nutrients*, 13(2): 530. (<https://doi.org/10.3390/nu13020530>).

Carley, D. W. y Farabi, S. S. (2016). Physiology of sleep. *Diabetes Spectrum*, 29(1): 5-9. <https://doi.org/10.2337/diaspect.29.1.5>.

Coles, L. D., Klitgaard, H., Kuker, M. J. C., Cloyd, J. C. (2017). Regulatory aspects for drug development. En: A. Pitkänen, P. S. Buckmaster, A. S. Galanopoulou, S. L. Moshé (eds.). *Models of seizures and epilepsy*. Segunda edición, Cap. 6: 69-82. Academic Press, Cambridge, MA.

Crawley, J. N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 9(1): 37-44. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90030-2).

Ebert, B., Wafford, K. A., Deacon, S. (2006). Treating insomnia: Current and investigational pharmacological approaches. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(3): 612-629. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.014>.

Edinger, J. D., Bonnet, M. H., Bootzin, R. R., Doghramji, K., Dorsey, C. M., Espie, C. A., Jamieson, A. O., Vaughn-McCall, W., Morin, Ch. M., Stepanski, E. J. (2004). Derivation of research diagnostic criteria for insomnia: report of an American Academy of Sleep Medicine Work Group. *Sleep*, 27(8): 1567-1596. <https://doi.org/10.1093/SLEEP/27.8.1567>.

Edinger, J. D. y Means, M. K. (2005). Overview of insomnia: Definitions, epidemiology, differential diagnosis, and assessment. En: M. H. Kryeger, M. H. T. Roth, W. C. Dement (eds.). *Principles and practice of sleep medicine*. Cuarta edición, Cap. 59: 702-713. Elsevier, Ámsterdam.

Fedotova, J., Kubatka, P., Büsselberg, D., Shleikin, A. G., Caprnda, M., Dragašek, J., Rodrigo, L., Pohanka, M., Gasparova, I., Nosal, V., Opatrilova, R., Qaradakh, T., Zulli, A., Kruzliak, P. (2017). Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95: 437-446. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.107>.

Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet-Pérez, E., Scheffer, I. E., Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4): 522-530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>.

Ford, D. E. y Kamerow, D. B. (1989). Epidemiologic study of sleep disturbances and psychiatric disorders. An opportunity for prevention? *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 262(11): 1479-1484. <https://doi.org/10.1001/jama.262.11.1479>.

Fraire-Martínez, M. I. (2013). Electroencefalograma y epilepsia. En: A. L. Velasco. *Epilepsia. Un punto de vista latinoamericano*. Primera edición, Cap. 6: 83-118. Solar, México.

García-García, M. E., García-Morales, I., Matías-Guiú, J. (2010). Modelos experimentales en epilepsia. *Neurología*, 25(3): 181-188. [https://doi.org/10.1016/S0213-4853\(10\)70007-4](https://doi.org/10.1016/S0213-4853(10)70007-4).

Goddard, G. V., McIntyre, D. C., Leech, C. K. (1969). A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology*, 25(3): 295-330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4981856>.

Gómez, C., Saldívar-González, J. A., Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25(1): 14-24.

González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., Hong, E. (1998). Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytother. Res.*, 12: 600-602. ([https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199812\)12:8<600::AID-PTR363>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199812)12:8<600::AID-PTR363>3.0.CO;2-N)).

González-Trujano, M. E., Carrera, D., Ventura-Martínez, R., Cedillo-Portugal, E., Navarrete, A. (2006a). Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1): 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.014>.

González-Trujano, M. E., Martínez, A. L., Reyes-Ramírez, A., Reyes-Trejo, B., Navarrete, A. (2006b). Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Medica*, 72(8): 703-707. <https://doi.org/10.1055/s-2006-931598>.

González-Trujano, M. E., Ponce-Muñoz, H., Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S. (2015). Depressant effects of *Agastache mexicana* methanol extract and one of major metabolites tilianin. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(3): 185-190. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60312-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60312-6).

González-Trujano, M. E., Brindis, F., López-Ruiz, E., Ramírez-Salado, I., Martínez, A., Pellicer, F. (2016). Depressant effects of *Salvia divinorum* involve disruption of physiological sleep. *Phytotherapy Research*, 30(7): 1137-1145. <https://doi.org/10.1002/ptr.5617>.

González-Trujano, M. E., Domínguez, F., Pérez-Ortega, G., Aguillón, M., Martínez-Vargas, D., Almazán-Alvarado, S., Martínez, A. (2017). *Justicia spicigera* Schltdl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92: 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.075>.

González-Trujano, M. E., Contreras-Murillo, G., López-Nájera, C. A., Hidalgo-Flores, F. J., Navarrete-Castro, A., Sánchez, C. G., Magdaleno-Madrigal, V. M. (2021a). Anticonvulsant activity of *Valeriana edulis* roots and valepotriates on the pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 265: 113299. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113299>.

González-Trujano, M. E., Urbina-Trejo, E., Santos-Valencia, F., Villasana-Salazar, B., Carmona-Aparicio, L., Martínez-Vargas, D. (2021b). Pharmacological and toxicological effects of *Ruta chalepensis* L. on experimentally induced seizures and electroencephalographic spectral power in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 271: 113866. (<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113866>).

González-Trujano, M. E., Krengel, F., Reyes-Chilpa, R., Villasana-Salazar, B., González-Gómez, J. D., Santos-Valencia, F., Urbina-Trejo, E., Martínez, A., Martínez-Vargas, D. (2022). *Tabernaemontana arborea* and ibogaine induce paroxysmal EEG activity in freely moving mice: Involvement of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neurotoxicology*, 89: 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.01.002>.

Gottesmann, C. (2002). GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience*, 111(2): 231-239. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00034-9).

Gould, T. D., Dao, D. T., Kovacsics, C. E. (2009). The Open Field Test. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*. (pp. 1-20). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1.

Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat, I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3): 385-403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>.

Heinze, G. y Camacho, P. (2010). *Guía clínica para el manejo de ansiedad*. En: S. Berenzon, J. del Bosque, J. Alfaro, M. E. Medina-Mora (eds.). Instituto Nacional de Psiquiatría, Serie: Guías clínicas para la atención de trastornos mentales. México.

He, L. Y., Hu, M. B., Li, R. L., Zhao, R., Fan, L. H., He, L., Lu, F., Ye, X., Huang, Y. L., Wu, C. J. (2021). Natural Medicines for the Treatment of Epilepsy: Bioactive Components, Pharmacology and Mechanism. *Frontiers in Pharmacology*, 12: 604040. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.604040>.

Howland, R. H. (2015). Buspirone: Back to the future. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, 53(11): 21-24. <https://doi.org/10.3928/02793695-20151022-01>.

Jones, B. E. (2005). From waking to sleeping: Neuronal and chemical substrates. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(11): 578-586. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.09.009>.

Kaczurkin, A. N. y Foa, E. B. (2015). Cognitive-behavioral therapy for anxiety disorders: An update on the empirical evidence. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3): 337-346. <https://doi.org/10.31887/dcns.2015.17.3/akaczurkin>.

Kandratavicius, L., Balista, P., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R. N., Umeoka, E. H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L. S., Leite, J. P., Alves Balista, P. (2014). Animal models of epilepsy: Use and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10: 1693-1705. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>.

Keene, A. C. y Duboue, E. R. (2018). The origins and evolution of sleep. *Journal of Experimental Biology*, 221 (Pt. 11): jeb159533. <https://doi.org/10.1242/JEB.159533>.

Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. *Archives of General Psychiatry*, 62(6): 593-602. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.593>.

Kim, S. R. (2016). Control of granule cell dispersion by natural materials such as eugenol and naringin: A potential therapeutic strategy against temporal lobe epilepsy. *Journal of Medicinal Food*, 19(8): 730-736. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3712>.

- Lemoine, P., Bablon, J. C., Da Silva, C. (2019). A combination of melatonin, vitamin B6 and medicinal plants in the treatment of mild-to-moderate insomnia: A prospective pilot study. *Complementary Therapies in Medicine*, 45: 104-108. (<https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.05.024>).
- Lewis, L. D. (2021). The interconnected causes and consequences of sleep in the brain. *Science*, 374(6567): 564-568. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABI8375>.
- Lezak, K. R., Missig, G., Carlezon, W. A. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2): 181-191. <https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.2/wcarlezon>.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2): 80-185. <https://doi.org/10.1007/BF00177912>.
- Lozano, J. (2000). El insomnio y la ansiedad. Medidas terapéuticas y tratamiento farmacológico. *Farmacia y Sociedad*, 19(2): 84-92.
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., Van Luijtelaaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology and Behavior*, 98(5): 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>.
- Manchishi, S. M. (2018). Recent advances in antiepileptic herbal medicine. *Current Neuropharmacology*, 16(1): 79-83. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170518151809>.
- Martínez, A. L., Domínguez, F., Orozco, S., Chávez, M., Salgado, H., González, M., González-Trujano, M. E. (2006). Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. leaves in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 106(2): 250-255. (<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.003>).
- Meaney, M. J., Liebowitz, M. L., Leonardo, E. D. (2015). Neurobiology of anxiety disorders. En: A. Tasman, J. Kay, J. A. Lieberman, M. B. First, M. B. Riba (eds.). *Psychiatry*. Cuarta edición, Cap. 20: 320-340. John Wiley & Sons, Ltd.
- Medina-Mora, M. E., Borges, G., Lara-Muñoz, C., Benjet, C., Blanco-Jaimes, J., Fleiz-Bautista, C., Villatoro-Velázquez, J., Rojas-Guiot, E., Zambrano-Ruiz, J., Casanova-Rodas, L., Aguilar-Gaxiola, S. (2003). Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental*, 26(4): 1-16.

- Mendelson, W. B. (2005). A review of the evidence for the efficacy and safety of trazodone in insomnia. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 66(4): 469-476. <https://doi.org/10.4088/JCP.v66n0409>.
- Miletínová, E., Bušková, J. (2021). Functions of sleep. *Physiological Research*, 70(2): 177-182. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934470>.
- Montgomery, S. A. y Kasper, S. (2007). Severe depression and antidepressants: Focus on a pooled analysis of placebo-controlled studies on agomelatine. *International Clinical Psychopharmacology*, 22(5): 283-291. <https://doi.org/10.1097/YIC.0b013e3280c56b13>.
- Mora-Gallegos, A. y Salas-Castillo, S. (2014). Modelos animales de miedo y ansiedad: Descripciones neuro-conductuales. *Actualidades en Psicología*, 28(117): 1-12. <https://doi.org/10.15517/ap.v28i117.14595>.
- Moul, D. E., Nofzinger, E. A., Pilkonis, P. A., Houck, P. R., Miewald, J. M., Buysse, D. J. (2002). Symptom reports in severe chronic insomnia. *Sleep*, 25(5): 553-563.
- Nofzinger, E. A., Buysse, D. J., Germain, A., Price, J. C., Miewald, J. M., Kopfer, D. J. (2004). Functional neuroimaging evidence for hyperarousal in insomnia. *American Journal of Psychiatry*, 161(11): 2126-2129. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.11.2126>.
- O'brien, C. P. (2005). Benzodiazepine use, abuse, and dependence. *Journal of Clinical Psychiatry*, 66 (Suppl. 2): 28-33.
- Oliva, I., González-Trujano, M. E., Arrieta, J., Enciso-Rodríguez, R., Navarrete, A. (2004). Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. Procera roots in mice. *Phytotherapy Research*, 18(4): 290-296. <https://doi.org/10.1002/ptr.1389>.
- Palacios, E. y Clavijo-Prado, C. (2016). Semiología de la crisis epiléptica: un reto clínico. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 25(4): 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.reper.2016.10.007>.
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Spence, D. W., Srinivasan, V., Dagan, Y., Cardinali, D. P. (2008). The roles of melatonin and light in the pathophysiology and treatment of circadian rhythm sleep disorders. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(8): 436-447. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0847>.

Parveen, A., Parveen, B., Parveen, R., Ahmad, S. (2015). Challenges and guidelines for clinical trial of herbal drugs. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*, (4): 329-333. (<https://doi.org/10.4103/0975-7406.168035>).

Pérez-Ortega, G., Guevara-Fefer, P., Chávez, M., Herrera, J., Martínez, A., Martínez, A. L., González-Trujano, M. E. (2008). Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico. *J. Ethnopharmacol.*, 116(3): 461-468. (<https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.007>).

Pérez-Ortega, G., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Brindis, F., Vibrans, H., Reyes-Chilpa, R. (2016). *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *J. Ethnopharmacol.*, 181: 221-228. (<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.040>).

Pitkänen, A., Buckmaster, P. S., Galanopoulou, A. S., Moshé, S. L. (eds.) (2017). *Models of seizures and epilepsy*. Segunda edición. Academic Press, Cambridge, MA.

Prut, L. y Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.*, 463(1-3): 3-33. ([https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)).

Reséndiz-Aparicio, J. C. (2013). Epidemiología de la epilepsia en América Latina. En: A. L. Velasco (ed). *Epilepsia. Un punto de vista latinoamericano*. Primera edición, Cap.1: 1-10. Editorial Solar, Cd. de México.

Riblet, L. A., Taylor, D. P., Eison, M. S., Stanton, H. C. (1982). Pharmacology and neurochemistry of buspirone. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 43(12 Pt. 2): 11-18.

Salín-Pascual, R. J. (2006). Actualización en el manejo farmacológico del insomnio crónico. *Revista Mexicana de Neurociencias*, 7(6): 604-610.

Sánchez-Cárdenas, A. G., Navarro-Gerrard, C., Nellen-Hummel, H., Hala-be-Cherem, J. (2016). Insomnio. Un grave problema de salud pública. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(6): 760-769. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27819787>.

Saper, C. B., Scammell, T. E., Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063): 1257-1263. <https://doi.org/10.1038/nature04284>.

Sarraís-Oteo, F. y De Castro-Manglano, P. (2007). El insomnio. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30 (Suppl. 1): 21-134. <https://doi.org/10.2307/j.ctvt7x7nn.15>.

Sarris, J., Panossian, A., Schweitzer, I., Stough, C., Scholey, A. (2011). Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology*, 21(12): 841-860. (<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.04.002>).

Sarris, J., McIntyre, E., Camfield, D. A. (2013). Plant-based medicines for anxiety disorders, part 2: a review of clinical studies with supporting preclinical evidence. *CNS drugs*, 27(4): 301-319. (<https://doi.org/10.1007/s40263-013-0059-9>).

Sarris, J. y McIntyre, E. (2017). Herbal anxiolytics with sedative actions. En: D. Camfield, E. McIntyre, J. Sarris (eds.). *Evidence-based herbal and nutritional treatments for anxiety in psychiatric disorders*. Primera edición, Cap. 1: 11-31. Springer, Nueva York.

Sartori, S. B. y Singewald, N. (2019). Novel pharmacological targets in drug development for the treatment of anxiety and anxiety-related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 204: 107402. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107402>.

Sateia, M. J., Buysse, D. J., Krystal, A. D., Neubauer, D. N., Heald, J. L. (2017). Clinical practice guideline for the pharmacologic treatment of chronic insomnia in adults: an american academy of sleep medicine clinical practice guideline. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 13(2): 307-349. <https://doi.org/10.5664/jcsm.6470>.

Savage, K., Firth, J., Stough, C., Sarris, J. (2018). GABA-modulating phyto-medicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Phytotherapy Research*, 32(1): 3-18. <https://doi.org/10.1002/ptr.5940>.

Scammell, T. E., Arrigoni, E., Lipton, J. O. (2017). Neural circuitry of wakefulness and sleep. *Neuron*, 93(4): 747-765. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.014>.

Schachter, S. C. (2009). Botanicals and herbs: A traditional approach to treating epilepsy. *Neurotherapeutics*, 6(2): 415-420. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.12.004>.

Shi, Y., Dong, J. W., Zhao, J. H., Tang, L. N., Zhang, J. J. (2014). Herbal insomnia medications that Target GABAergic Systems: A review of the psychopharmacological evidence. *Current Neuropharmacology*, 12(3): 289-302. <https://doi.org/10.2174/1570159X11666131227001243>.

Sucher, N. J. y Carles, M. C. (2015). A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 52: 308-318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.012>.

Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, 350(1): 21-29. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00223-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00223-4).

Ugalde, M., Reza, V., González-Trujano, M. E., Avula, B., Khan, I. A., Navarrete, A. (2005). Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(5): 631-639. <https://doi.org/10.1211/0022357056000>.

Van Vliet, E. A. y Gorter, J. A. (2017). Electrical stimulation seizure models. En: A. Pitkänen, P. S. Buckmaster, A. S. Galanopoulou, S. L. Moshé (eds.). *Models of seizures and epilepsy*. Segunda edición, Cap. 33: 474-488. Academic Press, Cambridge, MA.

Velíšková, J., Shakarjian, M. P., Velíšek, L. (2017). Systemic chemoconvulsants producing acute seizures in adult rodents. En: A. Pitkänen, P. S. Buckmaster, A. S. Galanopoulou, S. L. Moshé (eds.). *Models of seizures and epilepsy*. Segunda edición, Cap. 34: 491-512. Academic Press, Cambridge, MA.

Viola, A. U., Brandenberger, G., Toussaint, M., Bouhours, P., Paul-Macher, J., Luthringer, R. (2002). Ritanserin, a serotonin-2 receptor antagonist, improves ultradian sleep rhythmicity in young poor sleepers. *Clinical Neurophysiology*, 113(3): 429-434. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(02\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(02)00014-7).

Walf, A. A. y Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2): 322-328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.

Weber, F. y Dan, Y. (2016). Circuit-based interrogation of sleep control. *Nature*, 538(7623): 51-59. <https://doi.org/10.1038/nature19773>.

Winkelman, J. W., Buxton, O. M., Jensen, J. E., Benson, K. L., O'Connor, S. P., Wang, W., Renshaw, P. F. (2008). Reduced brain GABA in primary insomnia: Preliminary data from 4T proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS). *Sleep*, 31(11): 1499-1506. <https://doi.org/10.1093/sleep/31.11.1499>.

Xiao, F., Yan, B., Chen, L., Zhou, D. (2015). Review of the use of botanicals for epilepsy in complementary medical systems. *Traditional Chinese Medicine. Epilepsy and Behavior*, 52: 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.050>.

CAPÍTULO 9.

Métodos de bioevaluación para la búsqueda de moléculas con efecto espasmolítico y/o neuroprotector, utilizando el modelo de íleon aislado de cobayo

Rosa Ventura Martínez*

* Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

9.1 Modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo

El íleon aislado de cobayo es una preparación de un tejido intestinal que permite realizar pruebas fisiológicas y farmacológicas *in vitro* y que fue descrita inicialmente por Henrick Magnus (Staff of the Department of Pharmacology, 1968; Jespersen *et al.*, 2015). Es un modelo preclínico de órgano aislado, en el cual el tejido aislado del íleon de cobayo se sumerge en una solución amortiguadora con un pH de 7.2 que mantiene la presión osmótica del tejido tal y como si estuviera en el cuerpo del animal. Además, el tejido se debe mantener a una temperatura constante (37 °C) con burbujeo continuo de una mezcla de O₂ al 95 % y CO₂ al 5 % (carbógeno). Estas condiciones experimentales permitirán que el tejido permanezca viable y funcional durante varias horas.

La solución amortiguadora fue descrita por Hans Krebs en 1950, por lo que también se le conoce como solución Krebs, y contiene los iones y sales necesarias para mantener la actividad fisiológica normal del tejido. Su composición consta de las siguientes concentraciones de sales (mM): cloruro de sodio (NaCl, 118); cloruro de potasio (KCl, 4.7); cloruro de calcio (CaCl₂, 2.5); cloruro de magnesio (MgCl₂, 1.2); fosfato monosódico (NaH₂PO₄, 1.2); bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 25); glucosa, 11; y colina, 0.3 (Staff of the Department of Pharmacology, 1968; Jespersen *et al.*, 2015).

La respuesta que se mide en el íleon de cobayo es la contracción o relajación del tejido, mediante un transductor de presión que traduce la señal mecánica en una señal eléctrica para que sea transmitida a un sistema de registro. Este sistema permite visualizar la actividad del tejido aislado a lo largo del tiempo, para el estudio de los eventos fisiológicos involucrados en el movimiento intestinal y el efecto de los fármacos en evaluación (Jespersen *et al.*, 2015). El íleon de cobayo se compone de diversos tipos de células, pero las células responsables de su actividad contráctil son las células del músculo liso. En el músculo liso intestinal la contracción muscular depende del incremento de la concentración de calcio (Ca⁺²) intracelular que, en su mayoría, entra desde el exterior de las células a través de canales de calcio dependientes de voltaje; aunque también puede ser liberado desde el retículo endoplásmico de estas células.

El Ca^{+2} es un catión divalente que además de estar involucrado en la contractilidad, interviene en la actividad secretora y neuronal, y actúa como un activador importante en procesos enzimáticos de la célula, por lo que se considera un mensajero intracelular final. De cualquier manera, el inicio del proceso contráctil se produce por la entrada masiva de Ca^{+2} debido a la despolarización de la membrana, produciendo un incremento transitorio de la concentración intracelular de este ion. El Ca^{+2} se une a la calmodulina, una proteína reguladora intracelular, formando un complejo Ca^{+2} -calmodulina que activa a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina mediante fosforilación, lo que permite la activación de la ATPasa de miosina y la contracción muscular (Joshi et al., 2021).

El modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo se puede utilizar para el estudio de moléculas con diversos efectos farmacológicos; por ejemplo, para determinar el efecto espasmolítico y/o espasmogénico (Ventura-Martínez et al., 2011); y, de manera más reciente, se ha propuesto como un modelo adecuado para el cernimiento de fármacos con efecto neuroprotector (Rodríguez et al., 2006). Los fundamentos teóricos para estos usos del modelo en los estudios preclínicos serán tratados por separado en este capítulo.

9.2 Antecedentes que sustentan el uso del modelo de íleon de cobayo para la determinación del efecto espasmolítico de diversos tratamientos

Para comprender el uso de este modelo en la evaluación del efecto espasmolítico de tratamientos bajo estudio, primero debemos revisar algunos aspectos teóricos que nos permiten entender los mecanismos implicados en el efecto farmacológico evaluado, como la definición de espasmos intestinales, la anatomía y fisiología del tejido que se utilizará (íleon), así como el mecanismo involucrado en el efecto que se evaluará en este modelo.

9.2.1 Espasmos intestinales

Los espasmos intestinales son movimientos involuntarios de contracción sostenida y persistente del músculo liso intestinal. Se pueden originar por la activación del sistema nervioso autónomo (SNA), causando que el músculo liso intestinal reciba una cantidad elevada de impulsos que pro-

vocan contracciones sostenidas y frecuentes; o bien, por la activación del sistema nervioso entérico (SNE), provocando diversos cambios químicos y físicos alrededor del tejido. Los espasmos pueden ser consecuencia de un desequilibrio del sistema parasimpático y de las terminaciones colinérgicas en el intestino, lo cual provoca la liberación constante de acetilcolina (ACh), el principal neurotransmisor excitatorio del SNE. Algunas causas que provocan este desequilibrio pueden ser la irritación del tracto intestinal, la secreción elevada de hormonas, la presencia de agentes patógenos o toxinas, por obstrucción intestinal y, en varias ocasiones, por la predisposición de las personas a sufrir estrés nervioso (Hall, 2016).

Para el tratamiento de los espasmos intestinales se utilizan fármacos con efecto espasmolítico (antiespasmódicos), los cuales, ante un espasmo, inducen la relajación del músculo liso de diversas vísceras huecas como el intestino, la vesícula biliar, uretra y el útero (Hani, 2014).

9.2.2 Anatomía y fisiología del intestino delgado

En relación con la anatomía y fisiología del tejido se sabe que el intestino delgado es parte del sistema digestivo y se encuentra en el área denominada mesogastrio. Su principal función es la absorción de nutrientes y el desplazamiento de los alimentos ya digeridos hacia el colon para su posterior excreción. Se encuentra dividido en tres porciones: el duodeno, que es el segmento intestinal que se encuentra cerca del estómago; el yeyuno, que es la parte central del intestino delgado; y el íleon, que es la parte distal del intestino delgado y se encuentra unido a la unión ileocecal que es donde inicia el intestino grueso (Figura 1).

Varios estudios han demostrado que el íleon es el segmento intestinal más vascularizado y que se encuentra innervado por un mayor número de neuronas entéricas que los otros segmentos del intestino delgado (Navarro, 2009), por lo que este segmento se considera el más apropiado para el estudio de los cambios inducidos por los fármacos sobre la tensión muscular, ya que el efecto de cualquier sustancia que actúe a nivel intestinal será más evidente y fácil de analizar.

El intestino delgado es como un “tubo” que consta de diferentes capas que le proporcionan su funcionalidad característica: la serosa, una capa de

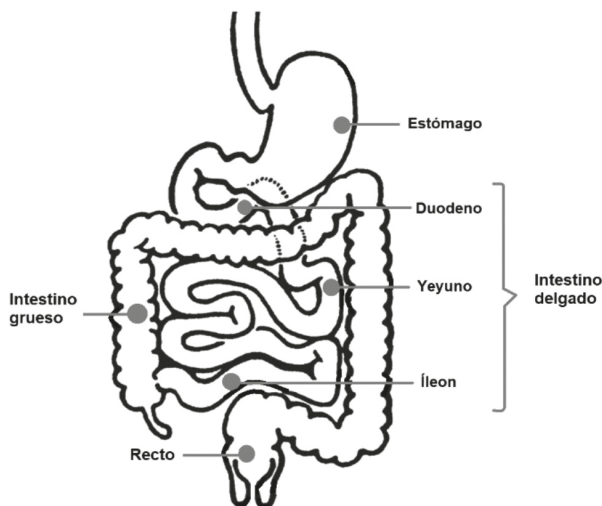


Figura 1. División anatómica del intestino delgado en donde se muestran las tres porciones que lo conforman: duodeno, yeyuno e íleon. También se muestra la ubicación anatómica del estómago, el intestino grueso y el recto, para hacer una ubicación más apropiada de cada segmento del intestino delgado. Modificado de: (https://www.niddk.nih.gov/media-assets/8340/N01081_H_thumbnail.jpg).

músculo longitudinal, una capa de músculo circular, la submucosa y la mucosa (Figura 2) (Costa et al., 2000).

Es importante mencionar que el intestino delgado cuenta con una innervación extrínseca y una intrínseca. La innervación extrínseca se encuentra controlada por el SNA, a través del sistema nervioso parasimpático, principalmente por el nervio vago. Las neuronas postganglionares del sistema parasimpático inervan a los plexos nerviosos del SNE y su estimulación da lugar a un aumento generalizado de la actividad del SNE por la acción de la acetilcolina. Mientras que la innervación intrínseca es controlada únicamente por el SNE (Hall, 2016; Venegas-Villalobos, 2007), el cual se explicará a detalle en el siguiente punto.

Para el empleo del modelo de íleon aislado de cobayo, es evidente que como se trata de un “órgano aislado” se descarta la innervación extrínseca, y el movimiento del tejido se atribuye sólo a la innervación intrínseca a cargo del SNE, que puede actuar de manera independiente controlando los

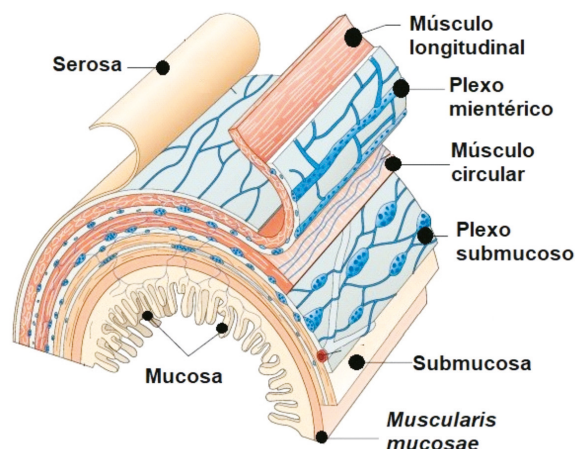


Figura 2. Capas que conforman el intestino delgado, donde se muestra la ubicación de los plexos nerviosos (el plexo mientérico y el plexo submucoso) que conforman el Sistema Nervioso Entérico (SNE). Modificado de: (<http://sistemanervioso.net/wp-content/uploads/2019/03/qu%C3%A9-es-el-sistema-nervioso-ent%C3%A9rico.jpg>).

movimientos peristálticos del músculo liso intestinal (Hall, 2016). Por eso es importante entender la fisiología de este sistema nervioso.

9.2.3 Sistema Nervioso Entérico (SNE)

El SNE está conformado por dos plexos nerviosos, el plexo mientérico o de Auerbach y el plexo submucoso o de Meissner. El plexo mientérico se encuentra entre las capas del músculo longitudinal y del músculo circular de la pared intestinal; mientras que el plexo submucoso se encuentra entre el músculo circular y la submucosa (Figura 2) (Furness, 2006).

El SNE es la parte más compleja del sistema nervioso periférico y ha sido considerado el “segundo cerebro”, ya que está compuesto por un gran número de neuronas entéricas distribuidas en ganglios que forman los plexos nerviosos del SNE. De hecho, se considera que este sistema nervioso está constituido por 80 a 100 millones de neuronas, que son una milésima parte de las que hay en el cerebro, pero una mayor cantidad de las que existen en la médula espinal. Las neuronas entéricas forman redes que se encuentran encargadas del control intrínseco de la motilidad del intestino delgado. La mayor parte de las neuronas involucradas en las funciones motoras

del intestino se encuentran localizadas en el plexo mientérico, con algunas neuronas aferentes primarias localizadas en el plexo submucoso (Costa et al., 2000).

Tipos de neuronas del SNE. Entre las neuronas del SNE se encuentran las *neuronas intrínsecas aferentes primarias*, tanto en el plexo mientérico como en el plexo submucoso. Estas neuronas responden a estímulos químicos y físicos como la deformación de la mucosa y la tensión del músculo, y se encargan de enviar las señales necesarias al resto del SNE (Costa et al., 2000). También hay *neuronas motoras*, las cuales reciben estímulos de las neuronas intrínsecas aferentes primarias y de las interneuronas descendentes y ascendentes. Éstas se proyectan hacia el músculo circular para estimularlo e inducir los movimientos peristálticos del intestino delgado. Las neuronas motoras se dividen en excitatorias e inhibitorias. Los principales neurotransmisores de las neuronas motoras excitatorias son la ACh y las taquicininas; mientras que los principales neurotransmisores de las neuronas motoras inhibitorias son la noradrenalina (NA), el óxido nítrico (ON), la adenosina trifosfato (ATP) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Por último, se encuentran las *interneuronas*, clasificadas como ascendentes y descendentes. Éstas tienen la función de integrar las señales recibidas por las neuronas intrínsecas aferentes primarias, para después transmitir las directamente a las neuronas motoras, y de esta manera regular la motilidad y función del intestino delgado (Kunze y Furness, 1999).

9.2.4 Mecanismo de acción de los agentes espasmolíticos

Los agentes espasmolíticos incluyen compuestos musculotrópicos y antagonistas colinérgicos muscarínicos. Uno de los agentes espasmolíticos más utilizados en la clínica es el bromuro de butilhioscina, mejor conocido como butilhioscina. La butilhioscina es un fármaco anticolinérgico que actúa antagonizando los receptores muscarínicos de la ACh, el principal neurotransmisor excitatorio encargado del aumento de la tonicidad del músculo intestinal.

Al igual que en otros tejidos con músculo liso, en el intestino delgado se presenta una combinación de receptores muscarínicos M_3 y M_2 . Los receptores M_3 están acoplados a una proteína Gq y están asociados directamente

a la respuesta contráctil del músculo liso; mientras que los receptores M_2 están asociados a una proteína Gi y a la inhibición de adenilato ciclasa (AC), evitando el incremento de la adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Al interactuar la ACh con los receptores muscarínicos M_3 presentes en las células del músculo liso intestinal, la proteína Gq acoplada a estos receptores es activada produciendo dos segundos mensajeros, el inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG), como producto de la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato (PIP_2), a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC).

Al interactuar el IP_3 sobre su receptor en el retículo sarcoplásmico (IP_3R), se abren los canales de calcio (Ca^{+2}) promoviendo su salida desde almacenes intracelulares. Esto produce un incremento de Ca^{+2} intracelular que, como se explicó previamente, es responsable de la activación de la miosina y la consecuente contracción muscular (Figura 3) (Ritter et al., 2020). Por lo tanto,

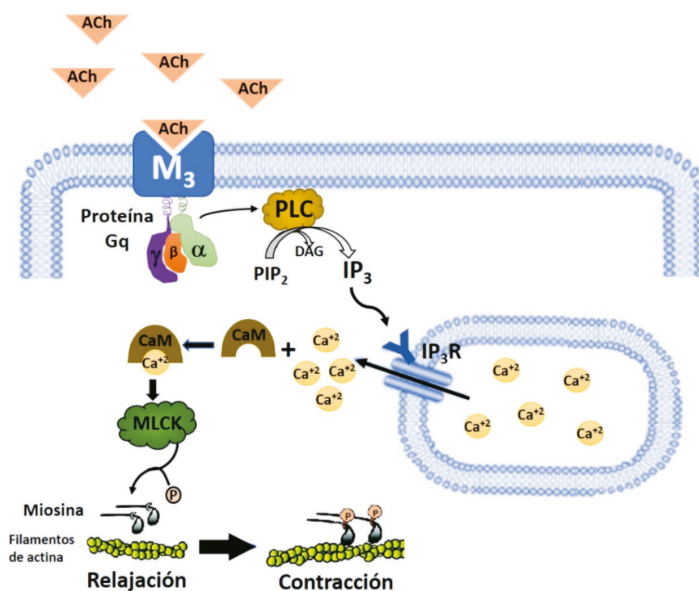


Figura 3. El receptor M_3 es un receptor metabotrópico acoplado a una proteína Gq, que al ser estimulado por ACh induce la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato (PIP_2), a través de la fosfolipasa C (PLC), produciendo inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG). El IP_3 se une a su receptor en el retículo sarcoplásmico (IP_3R) y se activa la salida de calcio (Ca^{+2}) al citosol. El Ca^{+2} se une a la calmodulina (CaM) activando a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), la cual fosforila a la miosina de cadena corta generando que ésta se desplace entre los filamentos de actina, produciendo así la contracción del músculo liso.

los fármacos que actúen como antagonistas de estos subtipos de receptores bloquearán la contracción inducida por la ACh e inducirán un efecto espasmolítico.

9.2.5 Protocolos para el estudio del efecto espasmolítico en el íleon aislado de cobayo

En el modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo se pueden utilizar varios protocolos para el estudio del efecto espasmolítico de diversos tratamientos (Ventura-Martínez *et al.*, 2011). Uno de ellos es utilizando un agente contráctil como el cloruro de potasio (KCl) para inducir la contracción del tejido, este es el protocolo más frecuentemente utilizado para la determinación del efecto espasmolítico en estudios farmacológicos. Se basa en que la administración de concentraciones altas de KCl (> 40 mM) sobre el músculo liso, produce un incremento en la concentración citosólica de Ca^{+2} a través de un mecanismo electromecánico. Ya que concentraciones extracelulares altas de K^{+} inducen la despolarización de la membrana, lo cual abre los canales dependientes de voltaje de Ca^{+2} tipo L, generando de esta manera un incremento en la concentración de este ion en el interior de la célula y, por consiguiente, la generación de la contracción bajo el mecanismo que ya fue mencionado previamente (Mita *et al.*, 2002).

Otro protocolo muy utilizado para la inducción de la contracción del íleon de cobayo es a través de la estimulación eléctrica (EE) del tejido. Este protocolo se basa en el conocimiento de que, al recibir un estímulo eléctrico con frecuencias de estimulación menores a 5 Hz, las neuronas motoras de rápida despolarización presentes en los plexos nerviosos del SNE se despolarizan por apertura de canales iónicos y liberan neurotransmisores sobre la placa muscular, principalmente ACh (Maske *et al.*, 1980). Al actuar la ACh sobre sus receptores muscarínicos presentes en el músculo liso intestinal inducen contracción.

Cualquier sustancia que sea capaz de inducir una disminución en el efecto contráctil del tejido pre-contráido con KCl o estimulación eléctrica, será considerada una sustancia con efecto espasmolítico y/o efecto relajante (Ventura-Martínez *et al.*, 2011).

9.2.6 Determinación del efecto espasmolítico del extracto de una planta y su comparación con un compuesto conocido, utilizando el modelo de ileon de cobayo

Para la determinación del efecto espasmolítico del extracto de una planta medicinal y/o alguno de sus metabolitos, es necesario tener un antecedente etnomédico que nos indique que la planta bajo estudio es utilizada en la medicina tradicional, para el alivio de los espasmos intestinales o alguna complicación sobre la motilidad intestinal. Posteriormente se tiene que elaborar un protocolo con los antecedentes del proyecto, el planteamiento del problema, la hipótesis de trabajo y el objetivo general, así como la metodología y el diseño experimental del estudio.

En este caso solo describiremos la metodología general y los resultados de un experimento, cuyo objetivo fue determinar el efecto espasmolítico de un extracto acuoso (ExtAq) de la *Datura stramonium* (*D. stramonium*), una planta medicinal que contiene compuestos con efectos anticolinérgicos, y compararlo con el efecto de una sustancia utilizada como control positivo como la escopolamina.

La escopolamina o hioscina es un antagonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina. Es un precursor del bromuro de butilhioscina, el fármaco antiespasmódico utilizado en la clínica descrito previamente. Sus semejanzas estructurales se pueden observar en la Figura 4.

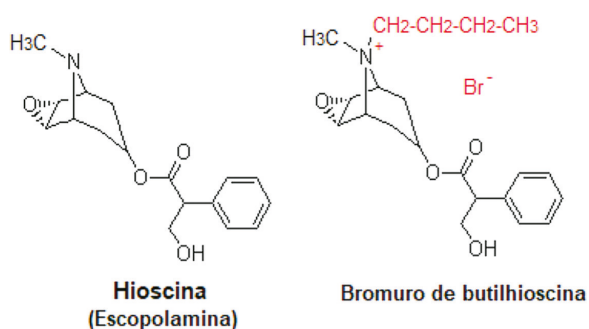


Figura 4. Estructura química de la hioscina y el bromuro de butilhioscina, un fármaco utilizado en la clínica con efecto antiespasmódico. La parte en rojo en la estructura de bromuro de butilhioscina muestra la diferencia estructural que tiene esta molécula con la de la hioscina.

Metodología general para la obtención del tejido. Para la obtención del íleon aislado de cobayo, se utiliza un cobayo Hartley de 300 a 400 g de peso corporal. Se realiza la eutanasia del animal por sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg), administrado por vía intraperitoneal (i. p.). Se realiza un corte en el abdomen y se localiza el segmento del intestino delgado próximo a la unión ileocecal, que es el que corresponde al íleon. Se corta un segmento del íleon y se coloca en una caja de Petri, con solución Krebs a 37 °C y con burbujeo de carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) para mantener las condiciones fisiológicas (la composición de la solución Krebs ya fue descrita al inicio del capítulo).

Al segmento extraído se le retira el tejido mesentérico y el tejido graso que se encuentra unido a la serosa. El tejido se corta en seis segmentos de 1.5 cm, y en los extremos de cada segmento se coloca un hilo para poder sujetarlos a las cámaras de órgano aislado y al transductor de presión. Posteriormente, cada segmento se coloca de manera vertical en las cámaras de órgano aislado, con solución Krebs a 37 °C y burbujeo constante. Uno de los hilos debe ir sujeto a la base de la cámara de órgano aislado, y el otro a un transductor de desplazamiento de fuerza (Grass) para registrar las contracciones isométricas (Figura 5A). La tensión inicial de los tejidos se fija a 1 g y las preparaciones se mantienen en equilibrio por aproximadamente 30 min, tiempo en que se registra la actividad espontánea del tejido en una hoja milimétrica, a través de un polígrafo Grass 7B (Figura 5B).

Protocolo de contracción del tejido con KCl. Después del periodo de equilibrio se adiciona una solución de KCl (60 mM), para inducir una contracción sostenida del tejido. Una vez que se alcance una respuesta contráctil sostenida y se mantenga sin cambios durante 5 min, se adiciona la concentración más baja del tratamiento a evaluar, que en este caso será el ExtAq de *Datura* (*D. stramonium*), para determinar cuánto disminuye la respuesta contráctil del tejido (Figura 6). Enseguida se realiza un “lavado al tejido” sustituyendo toda la solución Krebs, con el propósito de retirar cualquier sustancia del mismo. Se deja equilibrar nuevamente el tejido durante 10 min y se adiciona KCl para volver a contraerlo, seguido de la siguiente concentración del extracto que se está evaluando, y así sucesivamente hasta terminar con la evaluación del efecto de la escopolamina (control positivo) sobre el tejido pre-contraído.

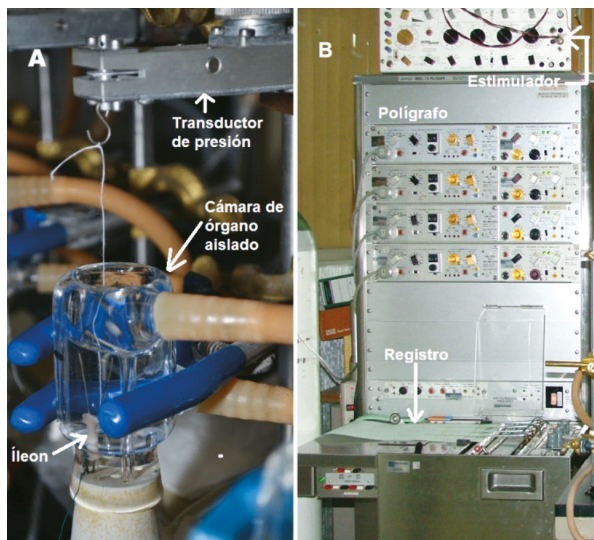


Figura 5. (A) Fotografía del tejido de órgano aislado colocado en la cámara, donde se muestra el tejido sumergido en la solución Krebs y cómo está sujeto al transductor de presión; (B) El sistema de registro (polígrafo) donde se muestran los componentes del equipo (amplificadores, preamplificadores, estimulador, papel de registro, etc.).

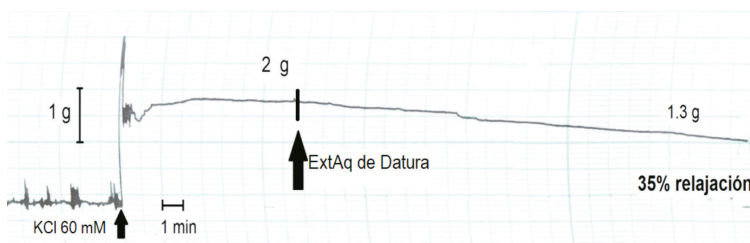


Figura 6. Registro representativo del efecto contráctil inducido por el KCl (60 mM) en el íleon aislado de cobayo, y de la disminución de este efecto después de la administración de una concentración del ExtAq de Datura (*D. stramonium*, 100 mg/mL); datos obtenidos con el sistema de registro del polígrafo.

Protocolo de contracción del tejido con EE. En otro grupo de tejidos, los segmentos se estimulan eléctricamente con una corriente de 14 volts, con una frecuencia de 0.3 Hz y pulsaciones de 3 ms de duración, empleando un estimulador y un splitter (S88 stimulator de GRASS y Med -Lab Stimu-Splitter II) hasta obtener la respuesta contráctil máxima de cada tejido. Una vez

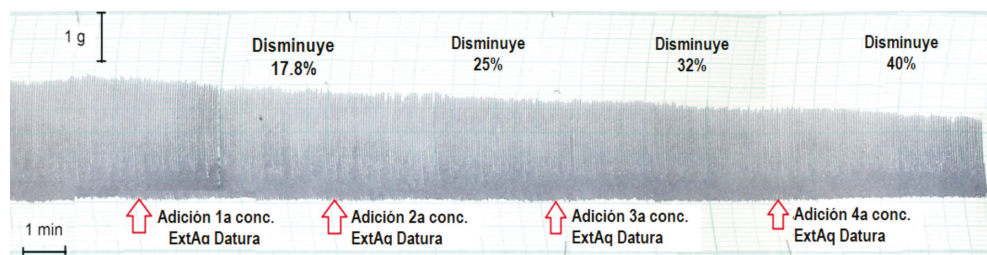


Figura 7. Registro representativo del efecto contráctil inducido por la estimulación eléctrica (EE), y de la disminución de este efecto después de la administración de diferentes concentraciones del ExtAq de *D. stramonium*.

alcanzada la respuesta máxima, se adiciona la primera concentración del ExtAq de *D. stramonium*, y se registra su efecto durante 2 min para determinar cuánto disminuye la respuesta contráctil del tejido (Figura 7). Posteriormente, se adiciona la siguiente concentración del ExtAq de *D. stramonium* y el tejido se deja en contacto con ésta durante otros 2 min, y así sucesivamente hasta llegar a la última concentración del extracto.

En ambos protocolos experimentales, el porcentaje de relajación se calcula restando la respuesta del tejido estimulado (con ACh o EE) en presencia del tratamiento (*g final*) a la respuesta del tejido estimulado sin tratamiento (*g inicial*) multiplicado por 100. El % de relajación representa el efecto espasmolítico del tratamiento evaluado.

Resultados de la determinación del efecto espasmolítico del ExtAq de *D. stramonium*. En la Figura 8 se muestra el efecto espasmolítico del extracto evaluado en el tejido pre-contraído con KCl (A) y con EE (B). En el primer caso, el extracto indujo un efecto espasmolítico significativo solo con las concentraciones de 3.2 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (25 ± 9 y 28.4 ± 7.8 %, respectivamente) (Figura 8A). Mientras que en el tejido pre-contraído con EE, el extracto indujo un efecto espasmolítico más pronunciado que alcanzó significancia estadística con las concentraciones de 0.32, 1 y 3.2 $\mu\text{g/mL}$ (37.3 ± 5.6 , 75.1 ± 4.8 y 90.9 ± 4.0 %, respectivamente) (Figura 8B).

Además, para determinar si en el efecto espasmolítico del extracto de *D. stramonium* estaba involucrada la escopolamina, uno de los componentes químicos identificado en esta planta, se siguió el siguiente procedimiento experimental. En otro grupo de tejidos y después del periodo de equilibrio,

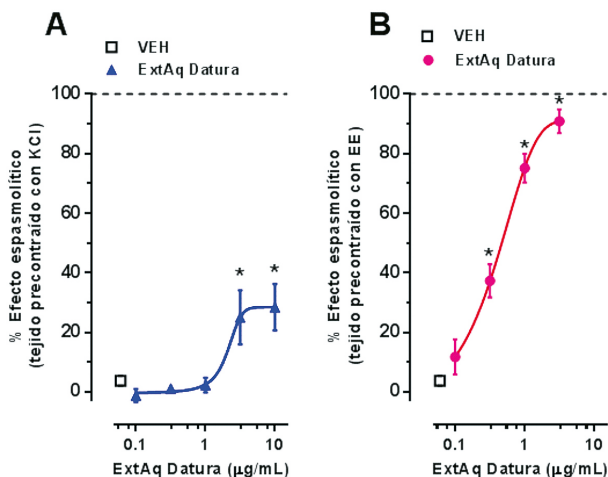


Figura 8. Curva concentración respuesta (CCR) del efecto espasmolítico del ExtAq de *D. stramonium* en el íleon de cobayo precontraído con (A) KCl (60 mM) y (B) EE. Cada punto representa la media $\pm$ error estándar de una $n = 5$ tejidos por tratamiento. El asterisco representa una diferencia significativa del tratamiento con respecto al grupo vehículo con una $p < 0.05$ (ANADEVA, seguida de una prueba de Dunnett).

se realiza una curva concentración respuesta (CCR) acumulativa de ACh (0.0001-100 μ M) en los segmentos intestinales. Una vez que se realiza la CCR a ACh control, los tejidos se incuban con una concentración del ExtAq de *D. stramonium* durante 5 min y se realiza otra CCR acumulativa de ACh. Posteriormente, y después del lavado y reposo de los tejidos, éstos se vuelven a incuban con la siguiente concentración del extracto y se realiza otra CCR a ACh. Finalmente, para comparar el efecto del extracto con el efecto de la escopolamina sobre la contracción inducida por ACh, los tejidos se incubaron con una solución de escopolamina y se realizó otra CCR a ACh (Ventura-Martínez et al., 2011).

Los resultados muestran que las dos concentraciones del ExtAq de *D. stramonium* desplazaron la CCR de ACh a la derecha, alcanzando un $E_{\text{máx}}$ muy cercano al obtenido con la CCR control de ACh (85.0 ± 6.0 , 86.8 ± 4 y 91.0 ± 8.0 %, respectivamente) (Figura 9A). Como podemos observar, el desplazamiento de las CCR de ACh fue paralelo a la curva original, lo cual indica que se trata de un efecto de antagonismo competitivo de algún componente del extracto con la ACh. Finalmente, la escopolamina mimetizó el efecto

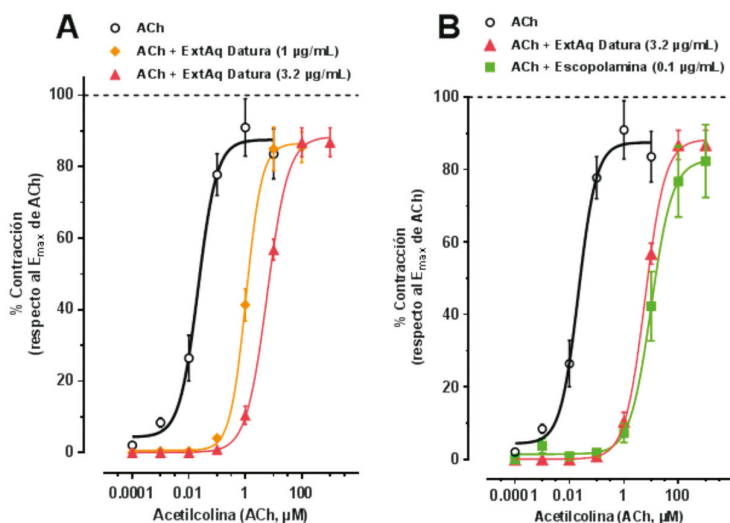


Figura 9. CCRs del efecto contráctil de ACh en ausencia y en presencia de: (A) dos concentraciones del ExtAq de *D. stramonium*; (B) escopolamina. Cada punto representa la media $\pm$ error estándar de una $n = 5$ tejidos por tratamiento.

del ExtAq de *D. stramonium* sobre la respuesta contráctil de la CCR de ACh, alcanzando un E_{max} muy parecido al de la CCR de ACh control (Figura 9A), lo cual nos confirma que uno de los compuestos responsables del efecto espasmolítico obtenido con el ExtAq de esta especie es la escopolamina.

9.3 Antecedentes que sustentan el uso del modelo de íleon de cobayo para la determinación del efecto neuroprotector de diversos tratamientos

El uso de este modelo para la evaluación del efecto neuroprotector de diversos tratamientos, se basa en el conocimiento de que el SNE presente en el intestino puede trabajar de manera independiente a la innervación central, y su estructura y neuroquímica semeja al SNC, de manera que diversos mecanismos patogénicos de este último –como desórdenes del espectro autista, enfermedad de Parkinson y Alzheimer– se han relacionado con alteraciones en el SNE (Rao y Gershon, 2016). De esta manera, se ha propuesto también el modelo de íleon aislado de cobayo, el cual contiene una innervación neuronal

muy importante, como un modelo para el estudio de fármacos con potencial efecto neuroprotector (Rodríguez et al., 2006).

9.3.1 *Neuroprotectores*

Los neuroprotectores se refieren a cualquier sustancia o molécula química o biológica, con efectos protectores sobre las células neuronales —unidad funcional del sistema nervioso central y periférico—, que previenen, mitigan o retrasan los procesos dañinos propios de enfermedades neurodegenerativas o lesiones cerebrales producidas por un trauma. Los compuestos neuroprotectores evitan el daño o la muerte de las neuronas (apoptosis), inducida por diversas enfermedades neurodegenerativas del SNC, como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, la esquizofrenia o el infarto cerebral, también conocido como enfermedad vascular cerebral (EVC) o accidente vascular cerebral (AVC). En este capítulo nos centraremos en el daño neuronal inducido por la EVC.

9.3.2 *Enfermedad vascular cerebral (EVC)*

La EVC es un problema de salud pública que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, está considerada como la segunda causa de muerte a nivel mundial (Arauz y Ruiz-Franco, 2012). Es un padecimiento de origen vascular que se caracteriza por la presencia súbita de una serie de signos y síntomas que revelan pérdida parcial o global de las funciones cerebrales, ocasionada por la oclusión o por la ruptura de un vaso sanguíneo. Esto ocasiona la reducción o suspensión total del flujo sanguíneo hacia el cerebro y produce lesión irreversible (necrosis) del tejido cerebral. El 85 % de los casos de EVC son de tipo isquémico, por lo que también se les conoce como isquemia cerebral (Lewandowski y Barsan, 2001).

Por su significado terapéutico, es importante señalar que entre el área del infarto y el tejido con perfusión sanguínea normal existe un área con perfusión restringida (área de penumbra), la cual es considerada como un área potencialmente recuperable y que es el blanco del tratamiento farmacológico con neuroprotectores (Figura 10). El área de penumbra isquémica se caracteriza por tener un flujo sanguíneo cerebral reducido sin propiedades de excitabilidad eléctrica, pero donde no se perturban irreversiblemente los gradientes de iones (Van der Worp y Van Gijn, 2007).

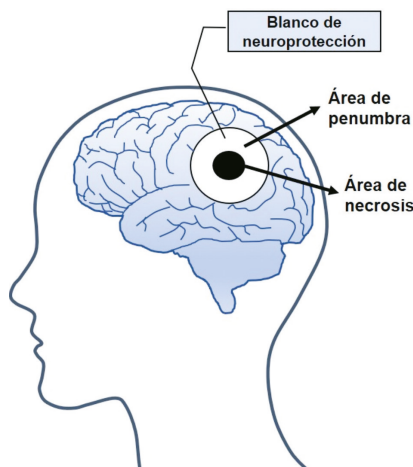


Figura 10. Imagen que representa un área cerebral dañada después de un EVC. Se muestra el área de necrosis (núcleo del infarto) y el área de penumbra (área con hipoperfusión sanguínea, pero con las células aún viables). El área de penumbra isquémica es el blanco de fármacos con efecto neuroprotector.

A la fecha, la terapia postinfarto sólo se refiere a las medidas generales de mantenimiento y a la disminución de la presión intracraneal, ya que los fármacos capaces de reducir el tamaño del infarto en animales de laboratorio carecen de eficacia clínica (Marmot y Poulter, 1992). En este sentido, los modelos animales juegan un papel muy importante en la continua búsqueda de compuestos con potencial efecto neuroprotector.

9.3.3 Fisiopatología del daño inducido por la isquemia

La isquemia aguda en el cerebro desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y largo plazo en las neuronas, que se inician con la falla energética relacionada con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y una disminución en la producción de trifosfato de adenosina (ATP), lo cual origina una disfunción de las bombas iónicas (bomba de sodio-potasio ATPasa y otras bombas iónicas dependientes de energía) y una pérdida progresiva del potencial de membrana. En estas condiciones, las neuronas y las células gliales se despolarizan (despolarización anóxica) por la entrada excesiva de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma, y la salida de potasio, incrementando la concentración de potasio extracelular.

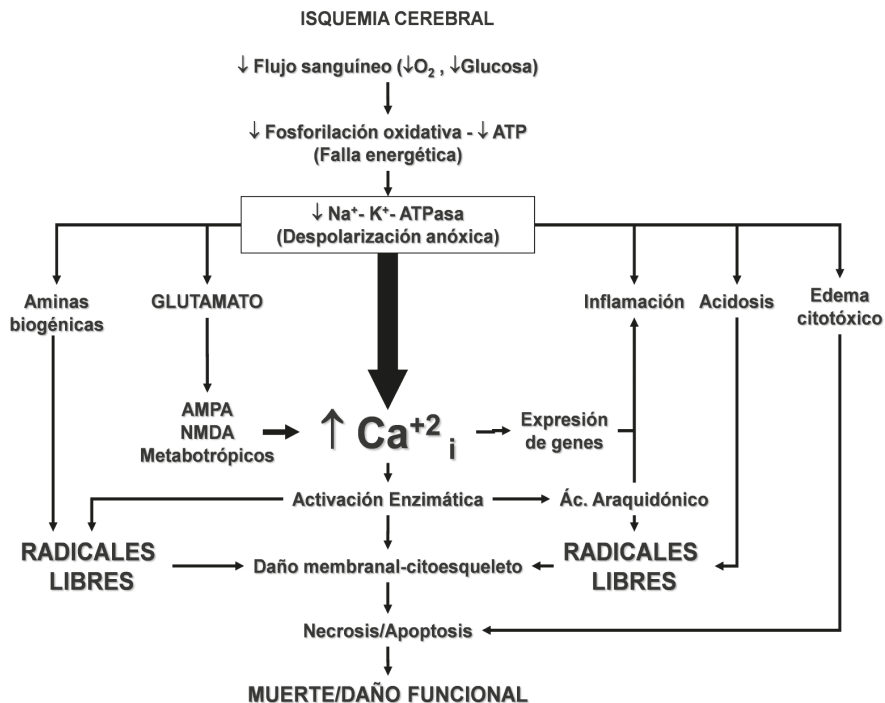


Figura 11. Imagen que muestra la cascada de eventos que se desencadenan con la isquemia y que culminan en la muerte neuronal.

La falla energética y la despolarización anóxica ocasionan la liberación de cantidades excesivas de glutamato en el espacio sináptico (Castillo *et al.*, 1996), que estimulan a los receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) y metabotrópicos. La sobrestimulación de estos receptores induce un incremento en las concentraciones de calcio intracelular, que activa una serie de enzimas (proteíncinasas, proteasas, fosfolipasas, endonucleasas, proteínofosfatasas y sintasas del óxido nítrico) e induce la formación excesiva de radicales libres, produciendo daño a la membrana de las células que lleva a muerte neuronal (Dirnagl *et al.*, 1999; Castillo, 2000). También se desencadenan otros procesos importantes como inflamación, acidosis y edema citotóxico que llevan a un proceso de apoptosis (Figura 11).

9.3.4 Modelos experimentales de daño por isquemia

La mayoría de los modelos animales que estudian el daño neuronal por isquemia son modelos *in vivo* que utilizan animales de laboratorio para tratar de reproducir un infarto cerebral, ya sea en modelos de isquemia global, focal o hemorrágica (Green et al., 2003). A nivel experimental, con el empleo de estos modelos animales, se ha demostrado la existencia de un gran número de moléculas capaces de interferir con la cascada de eventos que producen daño neuronal durante el evento isquémico; sin embargo, el daño tan severo que se produce en los animales de laboratorio durante el procedimiento, provoca un alto número de muertes con el consecuente incremento en el número de animales utilizados en los modelos *in vivo*. Además, hasta el momento, ninguna de las moléculas que han mostrado eficacia en los modelos animales ha sido capaz de reducir la mortalidad ni favorecer la recuperación funcional de los pacientes con infarto cerebral.

Esta falta de correlación entre los estudios experimentales y clínicos fundamenta los cuestionamientos a los modelos animales de isquemia cerebral y las críticas a los protocolos de estudio utilizados, principal motivo por el que se ha generado un gran interés en el desarrollo de modelos experimentales alternativos, especialmente de aquellos que permitan la identificación de moléculas clínicamente útiles (Green et al., 2003). Por esta razón, y considerando que se requiere de un modelo que utilice menos animales para realizar un cernimiento farmacológico de tratamientos con potencial efecto neuroprotector, nuestro grupo de investigación demostró la utilidad del modelo de íleon de cobayo para estudiar el daño neuronal inducido por isquemia.

La relación del daño neuronal inducido por la isquemia en las neuronas del SNC y el inducido en las neuronas mientéricas del SNE, se basa en que muchas de las propiedades de estas células en ambos sistemas nerviosos son semejantes. Como se mencionó previamente, el SNE comprende una colección de neuronas presentes en los plexos mientérico y submucoso (Lomax y Furness, 2000), que pueden funcionar de manera independiente del SNC y que produce 25 o más sustancias neurotransmisoras (Furness et al., 1999) involucradas en la transmisión de las sinapsis entéricas. Como otros órganos, la integridad del intestino delgado requiere un continuo aporte de

oxígeno y glucosa; y la isquemia / reperusión en el intestino dispara una cascada de eventos moleculares patológicos (Kong et al., 1998) similares a los descritos en la patogénesis de la isquemia cerebral (Del Zoppo et al., 2000).

9.3.5 Modelo de íleon de cobayo para evaluar efecto neuroprotector

Varios grupos de investigación han realizado estudios acerca del daño inducido por la isquemia intestinal y sus consecuencias en la disminución de la contracción del íleon, pero la mayoría de ellos se han enfocado a evaluar el daño sobre la mucosa intestinal (Mallick et al., 2004), y solo algunos estudios han evaluado el daño en las neuronas entéricas.

En ese sentido, nuestro grupo de trabajo realizó una serie de experimentos con el objetivo de demostrar que la preparación del íleon aislado de cobayo puede ser un modelo utilizado para evaluar daño neuronal inducido por isquemia y, en consecuencia, evaluar el posible efecto neuroprotector en este tipo de daño. Primero, fue necesario enfocarnos en la evaluación del daño neuronal inducido por la isquemia intestinal y su consecuente disminución en la función contráctil del tejido. Si tomamos en cuenta que la respuesta contráctil inducida por la EE del tejido intestinal, se atribuye a la liberación de neurotransmisores desde las neuronas mientéricas (respuesta neurogénica) y depende de la integridad neuronal, mientras que la respuesta contráctil inducida por la estimulación química con ACh es mediada directamente por la estimulación de los receptores muscarínicos presentes en el músculo liso intestinal (respuesta miogénica) y no depende de la integridad neuronal, esto nos permite distinguir la respuesta neurogénica del tejido con la no neurogénica (Rodríguez et al., 2006; Ventura-Martínez et al., 2008).

Nuestros resultados mostraron que la respuesta contráctil del tejido intestinal mediada por la EE es más sensible a la isquemia, que la respuesta mediada por la estimulación con ACh, y que la isquemia de 80 min reduce severamente la actividad contráctil del íleon de cobayo, en comparación con tejidos no isquémicos (control) (Figura 12) (Santiago-Mejía et al., 2007).

Además, cuando los tejidos fueron sometidos a varios tiempos de isquemia, se demostró que el daño tisular depende del tiempo y la intensidad de la isquemia, ya que a mayor tiempo de isquemia, se produce un mayor daño neuronal y menor efecto contráctil del tejido intestinal a la EE

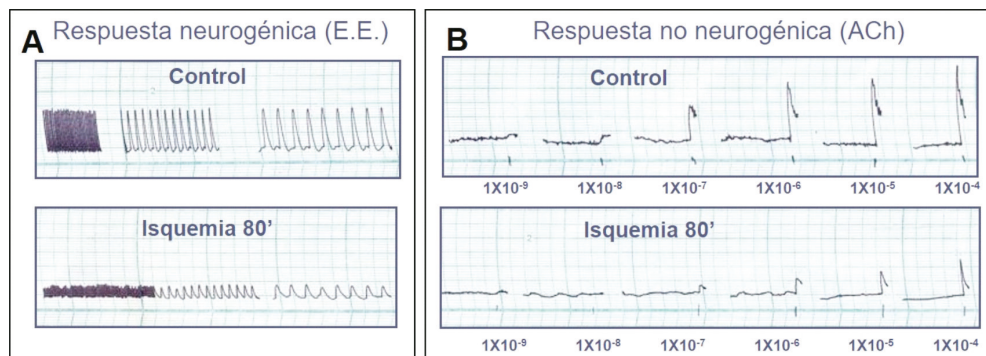


Figura 12. Registros de la actividad contráctil de tejidos no isquémicos (control) y tejidos con 80 min de isquemia intestinal sometidos a: (A) Estimulación eléctrica (EE 14 V, 5 ms duración); (B) Estimulación química con diferentes concentraciones de acetilcolina (ACh).

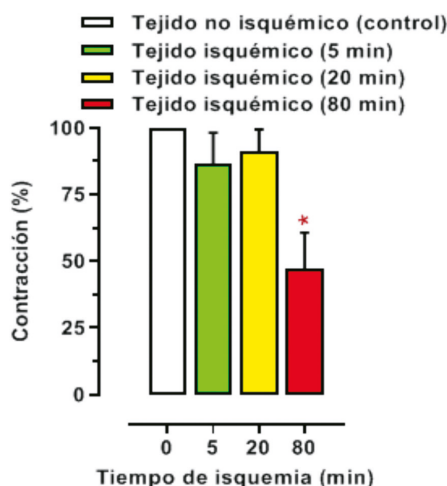


Figura 13. Actividad contráctil de tejidos no isquémicos (control) y tejidos con 5, 20 y 80 min de isquemia, sometidos a estimulación eléctrica de 14 V y 5 ms duración. El asterisco muestra que sólo el grupo de tejidos sometidos a 80 min de isquemia mostró diferencia significativa con el efecto contráctil inducido con EE de tejidos no isquémicos.

(Rodríguez et al., 2006). A través de estos experimentos se determinó que el tiempo adecuado de isquemia intestinal, para el estudio de fármacos con posible efecto neuroprotector —utilizando el íleon aislado de cobayo—, era de 80 min (Figura 13).

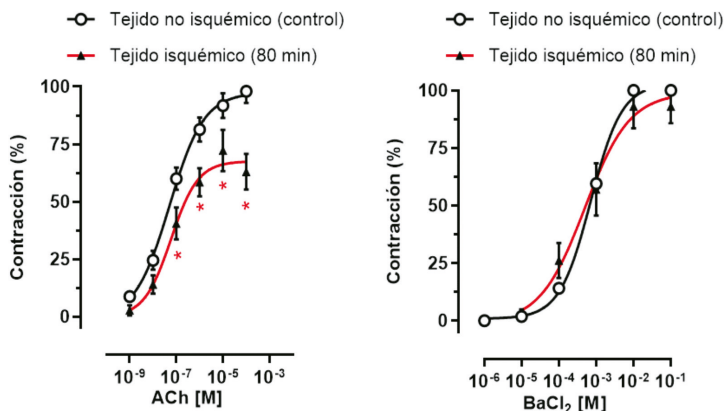


Figura 14. Actividad contráctil de tejidos de íleon de cobayo no isquémicos (control) e isquémicos estimulados con (A) acetilcolina y (B) cloruro de bario (BaCl_2).

El daño neuronal, pero no un daño muscular en intestinos sometidos a 80 min de isquemia, fue corroborado con los hallazgos que indican que la respuesta contráctil del tejido isquémico a la ACh y a la EE se ve afectada significativamente; mientras que la respuesta al cloruro de bario (BaCl_2) no se ve afectada (Figura 14). Recordemos que el bario (Ba^{+2}) contenido en el BaCl_2 es un ion bivalente como el calcio (Ca^{+2}), que es capaz de entrar en la célula muscular como si fuera Ca^{+2} e inducir la contracción de las células musculares, actuando directamente sobre los mecanismos de regulación contráctil intracelular del músculo liso y produciendo la contracción sin requerimiento de Ca^{+2} , a través de la formación de un complejo Ba^{+2} -calmodulina de manera independiente a la integridad de las neuronas.

También se ha propuesto que el Ba^{+2} actúa mediante el aumento de la afluencia de calcio extracelular o para liberar calcio de los almacenes intracelulares (Sato et al., 1987). Lo que sí es claro es que el Ba^{+2} actúa directamente a nivel de músculo liso, sugiriendo que ni la hipoxia ni la isquemia *in vitro* inducen daño sobre la maquinaria contráctil en el íleon de cobayo. Esto confirma que las neuronas mientéricas son más susceptibles al daño inducido por isquemia y/o hipoxia que las células del músculo liso.

Además de que la isquemia intestinal altera la funcionalidad del intestino a la estimulación química y eléctrica, también induce daño morfológico

en las neuronas mientéricas del íleon de cobayo (Rodríguez et al., 2006; Ventura-Martínez et al., 2008).

Finalmente, datos no publicados de nuestro grupo de investigación sugieren que varios fármacos que han mostrado efecto neuroprotector en diversos modelos de isquemia cerebral (como el ácido ascórbico, clometiazol, dextrometorfan, dextrorfan y dozicilpina, fenitoína, flunarizina y verapamil), mejoran la respuesta contráctil inducida por la EE de segmentos sometidos a 80 min de isquemia de íleon de cobayo, en comparación con tejidos isquémicos sin tratamiento, sugiriendo que estos compuestos tienen efecto neuroprotector en el modelo de isquemia intestinal en el íleon de cobayo.

9.3.6 Determinación del efecto neuroprotector de dos extractos, utilizando el modelo de isquemia de íleon de cobayo

Para la determinación del efecto neuroprotector de un extracto de una planta medicinal y/o alguno de sus metabolitos, también es necesario contar con antecedentes etnomédicos que nos sugieran que la planta bajo estudio puede tener un potencial efecto neuroprotector. Posteriormente se tiene que elaborar un protocolo con los antecedentes del proyecto, el planteamiento del problema, la hipótesis de trabajo y el objetivo general, así como con la metodología y el diseño experimental del estudio.

Aquí se describe solo la metodología general y los resultados de un experimento, cuyo objetivo fue determinar el efecto neuroprotector de diversos extractos (hexánico, metanólico y acuoso) de una planta medicinal, la *Tilia americana* var. *mexicana*, en el daño neuronal inducido por isquemia intestinal en el modelo de íleon de cobayo.

Metodología general para la obtención del tejido isquémico. Para la inducción de la isquemia neuronal en el íleon de cobayo, se utiliza un cobayo Hartley de 500 g de peso corporal. El animal se anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y, una vez que se encuentre bajo anestesia profunda, se realiza un corte en el abdomen con el propósito de localizar y exponer el segmento del intestino delgado próximo a la unión ileocecal, que es el que corresponde al íleon (Figura 15A). Una vez expuesto el segmento seleccionado, se colocan clips vasculares en las ramas de la arteria mesentérica

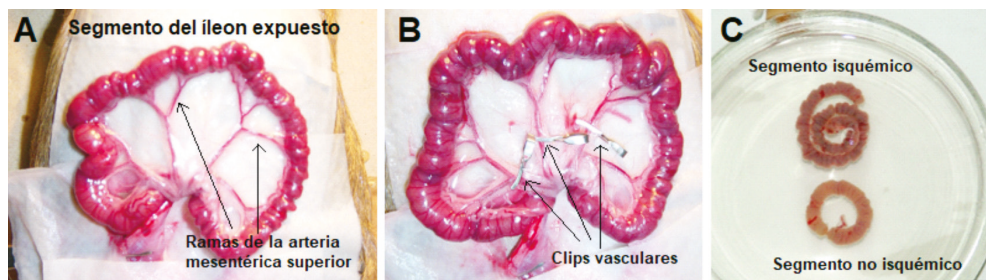


Figura 15. (A) Segmento intestinal expuesto en un cobayo anestesiado. (B) Colocación de los clips vasculares en las ramas de la arteria mesentérica para inducir la isquemia. (C) Segmento intestinal isquémico y segmento intestinal no isquémico (control) sumergido en solución Krebs.

superior, con el propósito de bloquear el flujo sanguíneo al segmento intestinal e inducir isquemia (Figura 15B).

Posteriormente, se introduce el segmento intestinal a la cavidad abdominal y se dejan transcurrir los 80 min de isquemia. Después, se corta el segmento isquémico y se obtiene también una parte de íleon no isquémico para utilizarlo como control. Los segmentos intestinales se colocan en una caja de Petri, con solución Krebs a 37 °C y con burbujeo de carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂), para mantener las condiciones fisiológicas durante 2 horas, lo que correspondería a un periodo de reperfusión (Figura 15C). Mientras transcurre el periodo de reperfusión, se limpian los segmentos del íleon del tejido mesentérico, así como de las venas rectas y del tejido graso que se encuentra unido a la serosa.

Luego se obtienen cinco segmentos de aproximadamente 1.5 cm de longitud del tejido isquémico y un segmento de la misma longitud del tejido no isquémico (control). Los tejidos se colocan en las cámaras de órgano aislado conectados a un transductor de desplazamiento de fuerza (Grass) para registrar las contracciones isométricas, tal como se describió previamente. Una vez transcurridas las 2 horas de reperfusión, los tejidos se estimulan eléctricamente con pulsos de corriente rectangular de 3 ms de duración y 14 volts de intensidad, para inducir la máxima respuesta a 0.3 Hz por medio de un estimulador Grass S88. También se construye una CCR a ACh y una a BaCl₂, para determinar la contracción del tejido (Rodríguez *et al.*, 2006).

Protocolo para la determinación del efecto neuroprotector de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de la *Tilia americana* var. *mexicana* en el íleon de cobayo. Para la determinación del posible efecto neuroprotector de los extractos de la planta utilizada en este estudio, los extractos de la planta se administraron una vez al día por vía oral en diferentes grupos de animales durante 2 semanas. Después del pretratamiento con las diferentes dosis de los extractos se indujo la isquemia intestinal y se determinó la respuesta de los tejidos intestinales a EE y química con ACh.

Resultados de la determinación del efecto neuroprotector de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de la *Tilia americana* var. *mexicana* en el íleon de cobayo. Como se observa en la Figura 16, los extractos hexánico (HEX, 300 mg/kg) y acuoso (AQUO, 300 mg/kg), pero no el metanólico (MeOH) de la *T. americana*, aumentaron la respuesta contráctil de los tejidos isquémicos a la estimulación eléctrica (Figura 16A), en comparación con los tejidos isquémicos de animales sin tratamiento, alcanzando un efecto contráctil similar al de los tejidos isquémicos de animales tratados con verapamil, un bloqueador de canales de calcio utilizado como control positivo.

Por otro lado, la respuesta contráctil a la ACh de los tejidos isquémicos con los extractos HEX y AQUO, fue también similar a la respuesta de los tejidos isquémicos con verapamil y significativamente mayor a los tejidos isquémicos sin tratamiento (Figura 16B). Además, el efecto contráctil de los tejidos no isquémicos e isquémicos con BaCl_2 no fue alterado, alcanzando una contracción de cerca de 3 gramos en ambos casos. Todos estos resultados sugieren que los extractos hexánico y acuoso de la planta bajo estudio, producen un efecto neuroprotector en las neuronas mientéricas del íleon de cobayo sometidas a 80 min de isquemia (Ángeles-López et al., 2013).

El uso del modelo del íleon de cobayo sometido a isquemia nos permite reconocer los extractos vegetales o moléculas con posible efecto neuroprotector, como alternativa para el tratamiento de la EVC, mediante el empleo de un modelo experimental adecuado que permite el cernimiento de especies mexicanas, lo que resulta importante en la investigación básica.

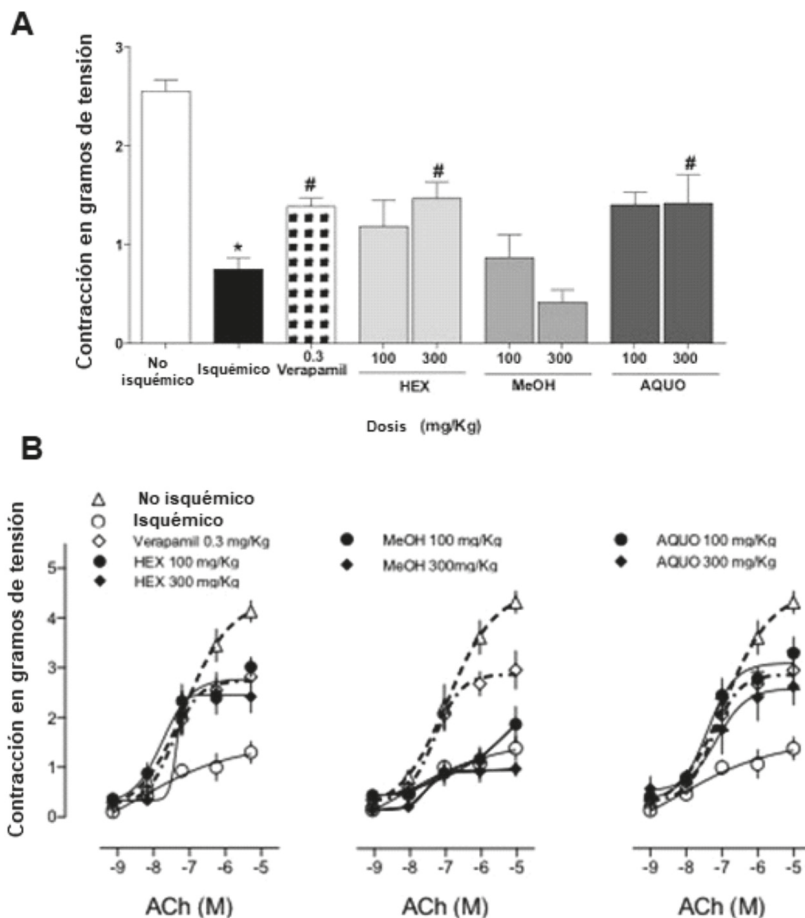


Figura 16. Respuesta contráctil de segmentos intestinales isquémicos de cobayos con pretratamiento con tres extractos de *T. americana* var *mexicana* sometidos a: (A) estimulación eléctrica transmural (EE); (B) estimulación química con acetilcolina (ACh). El asterisco (*) representa diferencia estadística en comparación con el tejido no isquémico, y el símbolo de gato (#) representa diferencia estadística en comparación con el tejido isquémico. Figura modificada de Ángeles-López et al., 2013.

Referencias

Ángeles-López, G. E., González-Trujano, M. E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R. (2013). Neuroprotective evaluation of *Tilia americana* and

Annona diversifolia in the neuronal damage induced by intestinal ischemia. *Neurochemical Research*, 38(8): 1632-1640. doi: 10.1007/s11064-013-1065-5.

Arauz, A. y Ruiz-Franco, A. (2012). Enfermedad vascular cerebral. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*, 55(3): 11-21.

Castillo, J., Dávalos, A., Naveiro, J., Noya, M. (1996). Neuroexcitatory amino acids and their relationship to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke*, 27(6): 1060-1065. doi: 10.1161/01.STR.27.6.1060.

Castillo, J. (2000). Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Revista de Neurología*, 30(5): 459-464. doi: 10.33588/rn.3005.99500.

Costa, M., Brookes, S. J. H., Hennig, G. W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous System. *Gut*, 47 (Suppl. 4): iv15-iv19. doi: 10.1136/gut.47.suppl_4.iv15.

Del Zoppo, G., Ginis, I., Hallenbeck, J. M., Iadecola, C., Wang, X., Feuerstein, G. Z. (2000). Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathology*, 10(1): 95-112. doi: 10.1111/j.1750-3639.2000.tb00247.x.

Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9): 391-397. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.

Furness, J. B., Bornstein, J. C., Kunze, W. A. A., Clerc, N. (1999). The enteric nervous system and its intrinsic connections. En: T. Yamada, D. H. Alpers, L. Laine, Ch. Owyang y D. W. Powell (eds.). *Textbook of Gastroenterology*. Primera edición (p.p. 11-35). Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.

Furness, J. B. (2006). *The enteric nervous system*. Primera edición. Blackwell Publishing, Australia. doi:10.1002/9780470988756.

Green, R., Odergren, T., Ashwood, T. (2003). Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends in Pharmacology Sciences*, 24(8): 402-408. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00192-5.

Hall, J. E. (2016). *Guyton y Hall: Tratado de Fisiología Médica*. Décima tercera edición. Elsevier, España.

- Hani, A. (2014). Antiespasmódicos. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 44 (Suppl. 2): S56-S60.
- Jespersen, B., Tykocki, N. R., Watts, S. W., Cobbett, P. J. (2015). Measurement of Smooth Muscle Function in the Isolated Tissue Bath-applications to Pharmacology Research. *JoVE Journal (Journal of Visualized Experiments)*, 95: e52324. doi:10.3791/52324.
- Joshi, V., Strege, P. R., Farrugia, G., Beyder, A. (2021). Mechanotransduction in gastrointestinal smooth muscle cells: role of mechanosensitive ion channels. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 320(5): G897-G906. doi:10.1152/ajpgi.00481.2020Crossref.
- Kong, S. E., Blennerhassett, L. R., Heel, K. A., McCauley, R. D., Hall, J. C. (1998). Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Australian & New Zealand Journal of Surgery*, 68(8): 554-561. doi: 10.1111/j.1445-2197.1998.tb02099.x.
- Kunze, W. A. A. y Furness, J. B. (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annual Review Physiology*, 61: 117-140. doi: 10.1146/annurev.physiol.61.1.117.
- Lewandowski, Ch. y Barsan, W. (2001). Treatment of acute ischemic stroke. *Annals of Emergency Medicine*, 37(2): 202-216. doi: 10.1067/mem.2001.111573.
- Lomax, A. E. y Furness, J. B. (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell & Tissue Research*, 302(1): 59-72. doi: 10.1007/s004410000260.
- Mallick, I. H., Yang, W., Winslet, M. C., Seifalian, A. M. (2004). Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digestive Disease and Sciences*, 49(9): 1359-1377. doi:10.1023/b:ddas.0000042232.98927.91.
- Marmot, M. G. y Poulter, N. R. (1992). Primary prevention of stroke. *The Lancet*, 339 (8789): 344-347. doi: 10.1016/0140-6736(92)91659-v.
- Maske, R., Orlandi, B., Dowdle, E. B. (1980). Contractile responses of guinea-pig ileum to high frequency electrical field stimulation. *European Journal of Pharmacology*, 67(1): 47-52. doi: 10.1016/0014-2999(80)90007-2.
- Mita, M., Yanagihara, H., Hishinuma, S., Saito, M. A., Walsh, M. P. (2002). Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth

muscle involves Rho-associated kinase. *The Biochemical Journal*, 364 (Pt. 2): 431-440. doi: 10.1042/BJ20020191.

Navarro, A. (2009). *Anatomía quirúrgica del yeyuno-íleon*. Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA), II-240, pp. 1-8.

Rao, M. y Gershon, M. (2016). The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Natural Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 13: 517-528. doi.org/10.1038/nrgastro.2016.107.

Ritter, J., Flower, R., Henderson, G., Kong, Y., MacEwan, D., Rang, H. (2020). *Rang & Dale's Pharmacology*. Novena edición. Elsevier, United Kingdom.

Rodríguez, R., Ventura-Martínez, R., Santiago-Mejía, J., Ávila-Costa, M. R., Fortoul, T. I. (2006). Altered responsiveness of the guinea-pig isolated ileum to smooth muscle stimulants and to electrical stimulation after in situ ischemia. *British Journal of Pharmacology*, 147(4): 371-378. doi: 10.1038/sj.bjp.0706618.

Santiago-Mejía, J., Ventura-Martínez, R., Gómez, C., Parra-Gámez, L., González-Ríos, J., Rodríguez, R. (2007). Polyviewed expression of the altered contractility of the guinea-pig ileum after ischemia in situ and superfusion in vitro. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58(2): 275-285. PMID: 17622697.

Satoh, S., Kubota, Y., Itoh, T., Kuriyama, H. (1987). Mechanisms of the Ba²⁺-induced contraction in smooth muscle cells of the rabbit mesenteric artery. *Journal of General Physiology*, 89(2): 215-237. doi: 10.1085/jgp.89.2.215.

Staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh (1968). *Pharmacological experiments on isolated preparations*. Primera edición. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London.

Van der Worp, H. B. y Van Gijn, J. (2007). Clinical practice. Acute Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine*, 357(6): 572-579. doi: 10.1056/NEJMcp072057.

Venegas-Villalobos, G. (2007). Gastrointestinal motility: what is normal or abnormal? (I) Anatomy and physiology of the digestive tract. *Medwave*, 7(7): e3245. doi: 10.5867/medwave.2007.07.3245.

Ventura-Martínez, R., Rivero-Osorno, O., Gómez, C., González-Trujano, M. E. (2011). Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3): 1528-1532. doi: 10.1016/j.jep.2011.08.047.

Ventura-Martínez, R., Santiago-Mejía, J., Gómez, C., Rodríguez, R., Fortoul, T. I. (2008). Acute morphological changes in guinea-pig ileum myenteric neurons after ischemia in situ with superfusion in vitro. *Pathology Research Practice*, 204: 121-127. doi: 10.1016/j.prp.2007.10.011.

Capítulo 10.

Modelos preclínicos para la evaluación de compuestos con potencial actividad antinociceptiva

Myrna Déciga Campos*

* Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

10.1 Introducción

El dolor es una experiencia fisiológica subjetiva compleja, en la cual cada persona experimenta una sensación diferente ante un mismo estímulo nocivo y de acuerdo con un modelo biopsicosocial; en este proceso intervienen factores biológicos, psicológicos y sociales. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, 2020) lo define como: *Una vivencia sensitiva y emocional desagradable asociada, o semejante a ésta, con una lesión tisular real o potencial* (Raja et al., 2020). Eso significa que el dolor no solo se presenta ante un daño en el organismo, sino que otros factores como los psicológicos pueden desencadenar la percepción del dolor; entonces, las emociones como el estrés, la ansiedad, la depresión y el miedo determinan la experiencia subjetiva del dolor.

Clasificación del dolor

El dolor puede dividirse en dos categorías, una es no patológica y sirve para alertarnos de algún daño en el organismo, mientras que el dolor patológico se presenta ante un daño que el organismo no puede resolver. Este último se puede clasificar, de acuerdo con la intensidad que presenta, en leve, moderado o intenso. Y también, de acuerdo con el daño que produce, se puede clasificar en nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional (Latremoliere y Woolf, 2009). Dependiendo de su origen, la percepción y evaluación clínica del dolor es diferente en cada individuo. Debido a que se trata de un proceso de percepción, el dolor puede ser para una persona incapacitante, en tanto que para otra no lo es.

Prevalencia del dolor

A nivel mundial el dolor ocasiona altos costos para muchos países, debido a la posible limitación de actividad laboral, ya que muchos pacientes requieren de años de rehabilitación. La presencia de dolor en una persona depende de su origen, el cual puede provenir de alguna amputación, presencia de osteoartritis, artritis reumatoide, dolor de espalda, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular y lesión cerebral traumática, entre otras causas.

En Estados Unidos se documentó que en el 2019, el dolor de espalda y la osteoartritis fueron las afecciones más prevalentes con altos costos médicos agregados; por ejemplo, el dolor de espalda se presentó en 33.9 % en adultos, con un costo estimado de \$365 000 millones de dólares en costos médicos en general. La osteoartritis, como una segunda causa de prevalencia (aproximadamente el 10.4 %), representó un gasto de \$460 000 millones de dólares en costos médicos. Estas dos condiciones son las más prevalentes y costosas en cuanto al empleo de medicamentos. El accidente cerebrovascular sigue estas condiciones tanto en la prevalencia (2.5 % – 3.7 %), como en los costos médicos (\$28 000 millones dólares). Otras afecciones pueden tener una prevalencia más baja, pero están asociadas con efectos per cápita relativamente más altos (Lo et al., 2021).

En México la situación no es diferente, por ejemplo, las enfermedades reumáticas como artritis reumatoide y la osteoartritis afectan aproximadamente a 10 millones de personas, la incidencia es mayor en mujeres (11.7 %) que en hombres (8.7 %). Los estados de la República con mayor prevalencia, en orden descendente, son: Chihuahua (20.5 %), Nuevo León (16.3 %), Ciudad de México (12.8 %), Yucatán (6.7 %) y Sinaloa (2.5 %) ($p < 0.01$) (Peláez-Balless et al., 2011). No se tienen datos específicos de los costos que conlleva esta enfermedad, pero se estima que son altos no solo para los pacientes, sino para las instituciones de Salud (Mould-Quevedo et al., 2008). Además, se debe considerar que en México también existen altas tasas de prevalencia del dolor asociado a neuropatías y cáncer.

Tratamiento del dolor

De acuerdo con la escalera analgésica del dolor, el tratamiento se basa en el empleo de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), fármacos como el ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ketorolaco y metamizol forman parte de este grupo. Cuando el dolor es más intenso y los AINE's presentan baja eficacia analgésica, se utilizan opioides como la buprenorfina, la morfina y el tramadol. Hay situaciones clínicas en que el dolor es tan intenso que los opioides no pueden resolverlo, entonces se recurre a combinaciones de AINE's con opioides. Desafortunadamente estas combinaciones no son suficientes para el tratamiento del dolor intenso, y por ello se requiere hacer una búsqueda de alternativas terapéuticas.

La búsqueda de estas últimas se basa en conocer los mecanismos nociceptivos involucrados en los diferentes tipos de dolor (Latremoliere y Woolf, 2009). Se recurre al reposicionamiento de fármacos, al diseño de algunos específicos para ciertos blancos moleculares (Capítulo 1) y a la evaluación de productos naturales (Quiñonez-Bastidas y Navarrete, 2021). También se investigan las interacciones farmacológicas entre fármacos que ya están en el mercado, fármacos y productos naturales, y la interacción entre productos naturales (Déciga-Campos y Ortiz-Andrade, 2015; 2021a,b). El análisis de las combinaciones de fármacos analgésicos es una estrategia para aumentar la eficacia terapéutica, disminuyendo las dosis de los fármacos que forman la combinación y, por consecuencia, disminuyendo los efectos adversos, sobre todo de muchos analgésicos que se ocupan de forma crónica como los AINE's y los opioides.

10.2 Nocicepción

El proceso fisiológico que determina la percepción del dolor se conoce como nocicepción. Ésta se refiere al proceso neural de codificación de estímulos nocivos, y funciona como un importante sistema de alarma que alerta al individuo sobre un daño. En presencia de un estímulo nocivo de naturaleza química, mecánica o térmica, se transmite una señal desde el sistema sensorial periférico (fibras nerviosas) hacia el sistema nervioso central, en donde la señal nociceptiva se percibe como dolor, de acuerdo con los componentes biopsicosociales presentes en cada sujeto.

La nocicepción es un proceso de protección ante un daño, los organismos generan una respuesta de reflejo para retirarse del estímulo. Mediante un comportamiento complejo, el organismo evita el contacto con lo que le genera daño, y esto le permite protegerse y prevenir lesiones. Sin embargo, cuando el estímulo es constante, el sistema sensorial se sensibiliza, es decir, el umbral de activación ante un daño disminuye y las respuestas a estímulos posteriores ocasiona que se genere una mayor amplificación.

En presencia de una patología, la nocicepción pierde su función de protección y se produce un aumento en la estimulación de los nociceptores. Cuando el sistema nociceptivo disminuye su umbral de activación se

conoce como hiperalgesia, y cuando se activa en presencia de un estímulo inocuo se le denomina alodinia (Latremoliere y Woolf, 2009).

10.3 Evaluación del dolor y la nocicepción

La evaluación del dolor en el humano se basa en el informe de la percepción del daño. Debido a que compartimos un lenguaje común, podemos calificar mediante una escala numérica (1–10) la experiencia de sufrimiento o malestar; el paciente también puede indicar si su percepción del dolor es leve, moderada o intensa (Raja et al., 2020). En el caso de los recién nacidos, se ha considerado que algunas manifestaciones pueden reflejar un estado de dolor. El Grupo de Trabajo de Dolor en Neonatología, Comité de Estudios Feto-Neonatales (CEFEN, 2019), ha descrito que el llanto, la expresión facial, el tono muscular o los signos vitales son importantes para interpretar el dolor.

Para la evaluación de la nocicepción se requiere utilizar animales como modelos experimentales, con ellos se pueden evaluar los procesos fisiológicos y patológicos que involucran al dolor y también se buscan las alternativas terapéuticas. Los modelos experimentales deben semejar una condición humana, para que puedan tener utilidad clínica. Se sabe que todos los animales poseen nociceptores (receptores de dolor), y en algunos grupos de animales, se ha demostrado que existen mecanismos fisiológicos consistentes que sustentan el sistema nociceptivo.

Especies animales para evaluar nocicepción

A continuación se describirán algunas de las características importantes que se han encontrado en especies invertebradas y vertebradas, para la caracterización del proceso nociceptivo y evaluación de tratamientos para el dolor (Figura 1). Los invertebrados, como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, así como los vertebrados no mamíferos como aves, reptiles, anfibios y peces, tienen nociceptores que pueden reaccionar a estímulos dañinos; sin embargo, se ha sugerido que solo los animales con un sistema nervioso especializado pueden procesar centralmente información nociceptiva (Sneddon, 2018).

Los modelos experimentales en invertebrados son de utilidad para reconocer los receptores involucrados en la percepción de estímulos

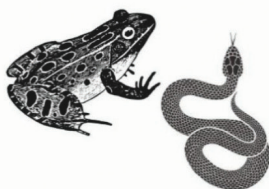
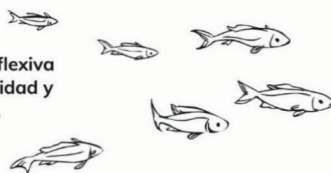
ANIMALES UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE

NOCICEPCIÓN



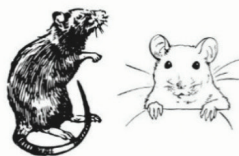
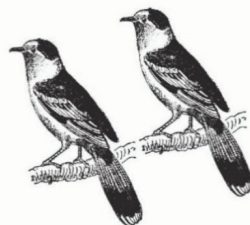
Los canales TRPV son una familia de canales iónicos sensoriales que se identificaron por primera vez en *Drosophila melanogaster*. Particularmente TRPA1 participa en su nocicepción térmica.

En los peces se puede evaluar una conducta reflexiva (natación/locomoción) o una conducta de actividad y reposo como parámetros de nocicepción.



Los anfibios tienen fibras nerviosas mielínicas y amielínicas en la piel, traducen estímulos térmicos, mecánicos y químicos nocivos. Las fibras A δ y C, son similares a las que se encuentran en los mamíferos en relación a sus características fisiológicas.

Las aves poseen los componentes neurológicos necesarios para responder a los estímulos nocivos de una manera similar a los mamíferos.



Los roedores son los animales más empleados para el estudio del proceso nociceptivo y evaluación de fármacos, debido a que posee un genoma muy similar al humano.

Figura 1. Animales utilizados para evaluar nocicepción. Se han desarrollado modelos experimentales de nocicepción en animales, desde invertebrados hasta mamíferos; con ellos se pueden dilucidar los mecanismos fisiológicos del proceso nociceptivo y el cernimiento de fármacos.

nociceptivos. Por ejemplo, en *Drosophila* se han detectado canales iónicos de potencial transitorio (TRP), particularmente receptores TRPV, TRPA1 y TRPM, así como canales de sodio y canales sensibles a ácido (ASIC) (Reaves y Wolstenholme, 2007). Debido a que estos canales se localizan en las terminales nerviosas periféricas, son de gran utilidad para conocer la fisiología y biología molecular del proceso nociceptivo. Aunque hace falta más investigación en modelos de nocicepción con invertebrados, se ha propuesto que estos modelos experimentales son de gran utilidad para analizar la genética de la nocicepción. Además, debido a que tienen un sistema nervioso simple, se podría favorecer el descubrimiento más rápido de compuestos bioactivos.

Los peces tienen un sistema sensorial diferente a los animales terrestres, ya que evolutivamente se han adaptado a la presión mecánica y la temperatura, y no todas las especies tienen fibras especializadas. Los peces son ectotérmicos, su temperatura corporal depende de la temperatura ambiental (típicamente 0 – 30 °C), mientras que los mamíferos son endotérmicos y mantienen una temperatura corporal de 37 °C. Por tanto, es probable que las temperaturas superiores a 30 °C sean perjudiciales para los peces, pero no para los mamíferos que tienen un umbral de calor más alto (Menke et al., 2011).

Las truchas tienen nociceptores muy semejantes a los mamíferos y pueden presentar hipersensibilización; aunque no tienen fibras C, las fibras A δ que están mielinizadas actúan como nociceptores polimodales y, por lo tanto, realizan la misma función que las fibras C de mamíferos. Los umbrales mecánicos de los nociceptores de trucha fueron similares a los encontrados en la córnea de mamíferos, donde se encuentran nociceptores polimodales de bajo umbral mecánico, así que, la hipersensibilidad podría deberse al daño de su piel (Sneddon, 2003).

El pez cebra, *Danio rerio*, es tropical y solo se ve afectado por temperaturas entre 36.5 °C y 40 °C; estos peces son los más utilizados en modelos de nocicepción, debido a que poseen vías neuroanatómicas desde áreas periféricas hasta el cerebro, que son comparables a las que se encuentran en otros grupos de vertebrados. Tanto el tracto espinotalámico como el trigémino transmiten dolor desde el cuerpo y la cara hasta el tálamo y las áreas corticales dentro del cerebro, así la nocicepción en el pez cebra se debe a la alta

especialización en las conexiones de sus vías periféricas hacia el sistema nervioso central (Malafoqlia et al., 2013).

Existe poca información sobre el uso de anfibios y reptiles para la evaluación del efecto nociceptivo. Evolutivamente, la aleta de pez pasó a ser una extremidad para este grupo de animales, lo que les permitió adoptar un estilo de vida terrestre que cambió las vías sensoriales que posee el pez. Se han identificado y caracterizado nociceptores en ambos taxones; por ejemplo, las serpientes crotalinas tienen fibra C y A- δ , pero la mayoría de las serpientes solo tienen fibras nociceptivas de tipo A- δ , estas fibras funcionan como las fibras C en el mamífero (Terashima y Liang, 1994).

Por el contrario, en los anfibios se ha encontrado que la mayoría de las fibras nociceptivas son de tipo C, las cuales tienen un umbral similar al de los mamíferos, menor a 7 °C para detectar frío y mayor de 40 °C para detectar calor, lo que respalda el hecho de que un estilo de vida terrestre puede influir en las respuestas nociceptivas térmicas (Hamamoto y Simone, 2003). Se ha demostrado que los anfibios presentan homología con los mamíferos en su sistema de nocicepción, tienen un tracto espinotalámico y trigémino para su neurotransmisión, además de que se han identificado receptores opioides μ , δ y κ (Stevens et al., 2007), así como receptores TRP (Tomohiro et al., 2013).

En las aves también se ha demostrado la neurotransmisión ascendente y descendente ante un estímulo nocivo. Se han identificado fibras A- δ y C que inervan la mucosa del pico, nasal y bucal, así como las patas; la respuesta nociceptiva es comparable a la de los nociceptores de mamíferos. Existe evidencia de los procesos de inflamación e hipersensibilización, y de cómo estos procesos disminuyen en presencia de compuestos que actúan a través de receptores opioides o mediadores antiinflamatorios (Douglas et al., 2018).

Sin duda los mamíferos tienen el sistema más especializado de nociceptores, los cuales van a reaccionar dependiendo de su ambiente. Por ejemplo, las ratas topo *Heterocephalus glaber* habitan madrigueras subterráneas mal ventiladas, lo que las expone a altas concentraciones de CO₂ causando acidosis periférica, esto ocasiona que las fibras C de estos animales no respondan a estímulos ácidos, aun cuando la rata expresa receptores sensibles a ácido y TRPV-1 (Smith et al., 2012). Así que, dependiendo del ambiente, los

mamíferos van a expresar de forma diferente la percepción de un estímulo nocivo. Los roedores son los animales más utilizados en investigación para la dilucidación molecular y anatómica del proceso nociceptivo, y como herramienta farmacológica para la evaluación de compuestos bioactivos.

10.4 Evaluación de nocicepción en roedores

Los roedores tienen una capacidad de experimentar nocicepción como un mecanismo de protección, que se manifiesta mediante una respuesta refleja (respuesta nocifensiva) y una conducta específica, tratando de evitar o reducir el daño que lo produce. En algunos modelos de nocicepción en ratones o ratas, hay un daño irreparable y el sistema de defensa del animal no podrá reparar el daño, por lo que se debe tener cuidado de no generar sufrimiento a los animales. Para poder establecer un modelo de nocicepción, es importante conocer primero la conducta normal del animal. En los modelos de nocicepción en roedores se administran estímulos algésicos (estímulo nocivo) o se aplican estímulos térmicos, mecánicos o químicos que producirán un cambio en la conducta normal; en el caso de roedores algunas conductas comunes se presentan como movimientos involuntarios, morder, lamer, y de protección hacia alguna extremidad.

Consideraciones generales para todos los modelos de nocicepción en roedores

Antes de mencionar las técnicas que se utilizan para evaluar nocicepción, es necesario mencionar algunas consideraciones generales que son importantes durante el empleo de roedores.

- Especie: Se debe seleccionar una especie de rata (150–200 g) o ratón (20–30 g) en edad adulta.
- Sexo: Debido a que en algunos modelos experimentales existe diferencia del efecto antinociceptivo entre machos y hembras, se recomienda utilizar un mismo sexo en un diseño experimental.
- Ambientación: Antes de la evaluación del efecto nociceptivo, los animales deben permanecer al menos cinco días antes en el área de experimentación, este periodo de adaptación es importante para que

en la manipulación se disminuya el estrés que puede modificar la respuesta evaluada.

- Equipos: Si se va a ocupar algún dispositivo para la evaluación, como una placa caliente o una malla metálica, es necesario que el animal se exponga a éste al menos una vez al día por al menos tres días antes de la evaluación de la nocicepción.
- Cirugías: En el caso de que se requiera una cirugía como la ligadura del nervio ciático, es importante que ésta sea realizada con medidas quirúrgicas; desinfección del área de cirugía, empleo de material desinfectado, para la piel se puede utilizar solución de yodo, clorhexidina 0.5 % o alcohol 70 %, no es necesario el empleo de antibióticos si se mantienen las condiciones adecuadas.
- Temperatura: Debido a que se evalúan conductas de los animales, se recomienda mantener siempre la temperatura adecuada (24 – 25 °C).
- Ambiente: Se debe evitar al máximo el ruido que pueda interferir en el área de experimentación. Se sugiere que el experimentador no lleve en su persona aromas que puedan interferir en la conducta, ya que los roedores tienen un olfato muy sensible. También debe evitarse el empleo de limpiadores aromáticos o cloro en el área de experimentación.
- Tiempo de corte: Se refiere al tiempo máximo en que se puede someter al animal a un estímulo algésico, esto permite limitar el estímulo para no generar un daño al animal.
- Evaluación: Cada uno de los sujetos de investigación, ratas o ratones, debe evaluarse de forma individual y nunca grupal. Los animales solo pueden utilizarse una sola vez e inmediatamente que termine la prueba deben ser sacrificados en una cámara de CO₂.
- CICUAL. Todos los protocolos deben ser evaluados por un comité de ética.

Es importante mencionar que un modelo adecuado de nocicepción, hiperalgesia o alodinia es aquel que cuenta con criterios bien establecidos de reproducibilidad, especificidad y sensibilidad. Por lo anterior, se sugiere

estandarizar los modelos de nocicepción con fármacos con actividad analgésica conocida como controles positivos.

10.4.1 Modelos de nocicepción que semejan un dolor de tipo nociceptivo

Los modelos de nocicepción de tipo nociceptivo son aquellos que evalúan el proceso fisiológico a partir de un daño. Cuando se percibe un estímulo nocivo, se desencadena en las fibras periféricas —mediante receptores y canales iónicos— la transducción de este estímulo a señales eléctricas. A través de un potencial de acción se transmite el estímulo hacia la médula espinal, en donde hay una conexión con neuronas de segundo orden hacia el cerebro, y allí se integra la percepción del estímulo nocivo. En respuesta a estímulos térmicos o mecánicos se interpreta la nocicepción mediante un reflejo o vocalización.

Existen en el mercado equipos que generan un estímulo térmico (“hot plate”, “hot/cold plate”, “tail flick” y “Hargreaves”) o mecánico (Randall-Sellito), que permiten caracterizar respuestas reflejas nocifensivas, debido a la integración del estímulo a nivel de sistema nervioso central.

En los modelos que utilizan un estímulo térmico se recomienda establecer el tiempo de corte, éste se refiere al tiempo de permanencia del animal con el estímulo nocivo, se determina el umbral máximo de estímulo que el animal soporta sin que se genere un daño al tejido. Si después del tiempo establecido el animal no responde, éste debe retirarse del estímulo térmico. El tiempo de corte varía entre especies de ratas y ratones, y entre los diferentes modelos térmicos. La conducta nocifensiva también es variable, ya que algunos animales pueden presentar retiro o lamida de las patas traseras, y otros pueden orinar e intentar escapar del estímulo.

Modelo de la placa caliente

El objetivo de utilizar el modelo de la placa caliente (“hot plate”) o caliente/fría (“hot/cold plate”), es determinar una respuesta antinociceptiva del fármaco a evaluar ante una temperatura fija. El método consiste en utilizar una superficie metálica a una temperatura determinada (caliente o fría), y sobre la superficie se coloca un cilindro de vidrio sin fondo. Inmediatamente después se cuenta el tiempo que tarda el animal en generar la primera conduc-

ta nocifensiva, que se denomina como “latencia de nocicepción” (Bannon y Malmberg, 2007). En este tipo de experimentos se sugiere como control positivo el uso de fármacos de tipo opiode, como la morfina o el tramadol.

En la Figura 2, se muestra un experimento que realizamos con un fármaco opiode fuerte como la morfina. En este experimento se formaron tres grupos de seis ratones, la administración se realizó por vía intraperitoneal. Al primer grupo se le administró solución salina (0.9 %), al segundo y tercer grupo se les administró las dosis de 10 y 30 mg/kg de morfina. 15 min después de la administración se introdujeron uno a uno a la placa caliente ($52 \pm 2^\circ\text{C}$) y se utilizó un tiempo de corte de 30 s, es decir, si a 30 s el animal no presenta la respuesta nocifensiva, se retira de la placa para evitarle algún daño de tejido en las patas.

Los animales se sometieron a la placa caliente en diferentes tiempos, cada 15 min hasta 120 min. Y se construyó un curso temporal graficando el tiempo vs. a la latencia de retiro. Se puede observar que cuando se administra la dosis de 10 mg/kg, la latencia de retiro se incrementa con respecto

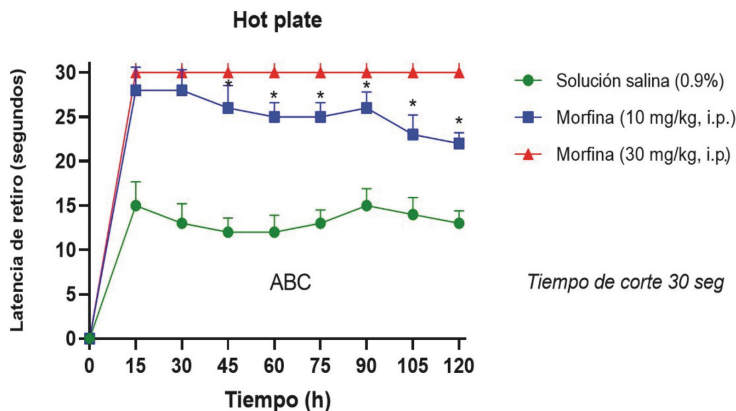


Figura 2. Curso temporal del efecto antinociceptivo de morfina en la placa caliente. La morfina (10 y 30 mg/kg, i.p.) y el vehículo (solución salina 0.9 %, i.p.) se administraron en un volumen de 0.1 ml/10 g de peso de ratones ICR. 15 min después los animales se colocaron sobre la placa caliente a una temperatura de $52 \pm 2^\circ\text{C}$. En el eje “X” se muestra el tiempo de evaluación después de la administración de morfina, y en el eje “Y” la latencia de retiro expresada como una conducta nocifensiva. Cada punto representa el promedio $\pm$ error estándar medio de seis animales. * Diferencia estadísticamente significativa entre morfina vs. el vehículo; ANOVA una vía, post-hoc Dunnett, $p \leq 0.05$.

a la administración de solución salina. Se observa también que la dosis de 30 mg/kg es suficiente para alcanzar el 100 % de respuesta antinociceptiva, ya que se tiene que retirar al animal en el tiempo de corte establecido. En este mismo experimento se puede obtener el efecto total nociceptivo [grupo de solución salina (0.9 %)] y el efecto antinociceptivo (grupos de morfina); para ello se determina el área bajo la curva (ABC) del curso temporal por el método de los trapecios, como se muestra en la Fórmula 1. En donde t es el tiempo de evaluación y E el efecto de latencia de retiro observado.

$$ABC|_0^t = \sum_{n=1}^k \left(\frac{E_{n+1} + E_n}{2} \right) (t_{n+1} - t_n) \quad (1)$$

Modelo térmico Hargreaves

El modelo plantar térmico “Hargreaves” tiene el mismo principio que la placa caliente, solo que en este caso se coloca al animal sobre una superficie de vidrio en cubos plexiglás, y el estímulo térmico se aplica en la pata trasera del animal, la conducta nociceptiva se cuantifica como la latencia de retiro de la pata. Un temporizador se inicia automáticamente con la fuente de luz, y la latencia de respuesta se define como el tiempo que requiere el animal para mostrar una retirada abrupta de la pata que recibió el estímulo. Se sugiere un tiempo de corte de 20 s para evitar lesiones tisulares. Las ratas deben ser aclimatadas a la cámara de prueba durante 20 – 30 min antes de la prueba (Yam *et al.*, 2020).

Modelo térmico tail flick

En la prueba de la sacudida de la cola “tail flick”, se aplica el estímulo térmico mediante una bombilla de proyección en la parte media de la cola, la conducta nociceptiva se determina como la latencia de retiro de la cola (Bannon y Malmberg, 2007; Yam *et al.*, 2020). En este modelo se sugiere un tiempo de corte menor con respecto a la placa caliente, para no generar daño al tejido.

Modelos de Randall-Sellito

Otro modelo nociceptivo no patológico es la presión mecánica ejercida en una pata del animal, el modelo se conoce como “Randall-Sellito”. En este modelo se va aumentando la presión (en gramos) en la pata del animal has-

ta que el animal retire la pata, vocalice o se alcance el tiempo de corte en gramos de presión (Yam *et al.*, 2020).

Comparación de los modelos de dolor de tipo nociceptivo

El objetivo del siguiente estudio fue comparar el efecto antinociceptivo de la morfina en tres modelos experimentales de dolor de tipo nociceptivo. La metodología usada fue la siguiente: Se administró morfina subcutánea a seis grupos experimentales, a cada grupo se le inyectó una dosis en una escala logarítmica (0.125 – 1.0 mg/kg), y cada uno de los animales fue colocado en la placa caliente, como se describió en el experimento de la Figura 2. También se utilizó un grupo adicional al que se le administró el vehículo (solución salina 0.9 %).

Se trazaron los cursos temporales y con el ABC se construyó la CDR, graficando la dosis *vs.* al % de respuesta antinociceptiva, considerando que el 100 % de nocicepción es generado por el ABC del grupo vehículo. El mismo procedimiento se realizó con otros grupos experimentales, pero utilizando el modelo de sacudida de cola “tail flick”, lo único que varió fue el tiempo de corte, que en este modelo fue de 8 s. Nuevamente el mismo procedimiento se realizó a otros grupos de animales, pero ahora utilizando el modelo de Randall-Sellito, en este modelo el umbral máximo de presión mecánica fue de 20 g.

En la Figura 3 se encuentra una gráfica de tipo CDR con los tres experimentos antes descritos, en ella se muestra el efecto antinociceptivo de la administración de morfina en ratas evaluadas en diferentes modelos de nocicepción. En la CDR se determinó la dosis efectiva cincuenta (DE_{50}) por medio de un método lineal logarítmico. Como se puede observar, existe una gran diferencia en el porcentaje de respuesta antinociceptiva que se obtiene en cada modelo experimental y, por consiguiente, la determinación de la dosis efectiva 50 (DE_{50}) es variable.

Se sabe que la prueba de la placa caliente y el modelo de presión mecánica activan un proceso de información nociceptiva a nivel supraespinal, mientras que el modelo de la sacudida de cola representa un reflejo espinal. Por lo anterior, es importante considerar cuáles son los mecanismos fisiológicos que se quiere explorar para seleccionar un modelo nociceptivo

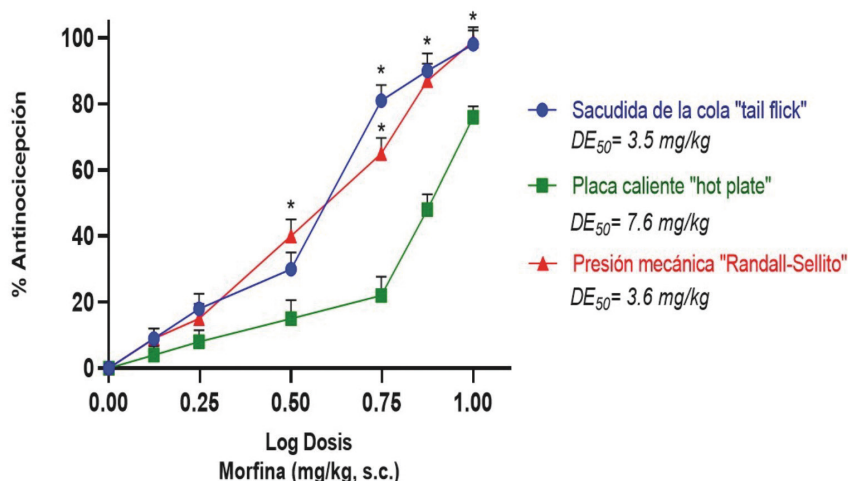


Figura 3. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo de morfina en diferentes modelos de nocicepción. La morfina se administró por vía subcutánea en dosis logarítmicas, en ratas Wistar (volumen de 0.1 ml/100 g de peso). La evaluación del efecto antinociceptivo se realizó con el modelo de sacudida de cola, placa caliente y presión mecánica. El tiempo de corte fue de 8 y 30 s para la prueba de sacudida de cola y placa caliente, respectivamente. El umbral máximo de presión mecánica fue de 20 g en la prueba de Randall-Sellito. Cada punto representa el promedio $\pm$ error estándar medio de seis animales. La DE_{50} se determinó considerando un método lineal logarítmico. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al modelo de la placa caliente, ANOVA una vía; post-hoc Tukey, $p \leq 0.05$.

adecuado, ya que no todas las moléculas bioactivas pueden ser exploradas en estos modelos. Algunas de estas moléculas no tienen efecto antinociceptivo en modelos de nocicepción térmica o mecánica, y sí tienen efecto en modelos inflamatorios.

10.4.2 Modelos de nocicepción que semejan un dolor de tipo nociceptivo-inflamatorio

Los modelos que generan daño en el sistema de neurotransmisión o el metabolismo del animal, se conocen como modelos de condición patológica. En esta clasificación se encuentran los que semejan un dolor de tipo inflamatorio, neuropático o funcional.

El proceso inflamatorio tiene como finalidad proteger el organismo de los patógenos invasores, promueve la remodelación y reparación de los tejidos. Sin embargo, si este proceso dura más de seis semanas, se vuelve crónico y produce un daño en el sistema de neurotransmisión, debido a la constante actividad de mediadores proinflamatorios. Para evaluar la nocicepción inflamatoria, se debe activar la operación del sistema inmune para que actúen los monocitos y se liberen sustancias inflamatorias como la serotonina, prostaglandinas, bradicinina, sustancia P, algunos iones como H^+ , Na^+ , K^+ , leucotrienos y citocinas, entre otros. Entonces, un daño químico generado por una sustancia irritante, una quemadura o una incisión quirúrgica permite el establecimiento de un fenómeno inflamatorio. La inflamación ocasiona la activación de nociceptores específicos que transmiten un potencial de acción hacia centros superiores, lo que se percibe como nocicepción (Muley et al., 2016).

La activación de los mediadores en los nociceptores genera un proceso que se conoce como hipersensibilidad, la cual conlleva a la presencia de hiperalgesia y alodinia. Con base en esto, se han desarrollado varios modelos químicos que consisten en la administración de sustancias que producen inflamación; entre ellas se encuentran la formalina (1 %), serotonina (10 mM o 1 %), bradicinina (10 mM), capsaicina (20 mM o 0.1 %), el ácido acético (0.6 %) y la solución ácida (pH = 5), entre otras. Algunos compuestos como la carragenina, el zimosan, el ácido úrico y el adyuvante de Freund generan un componente inflamatorio de mayor intensidad. Dependiendo de la concentración que se utilice de los compuestos algésicos, el proceso de nocicepción inflamatorio puede ser de leve a severo, y se pueden tener efectos nociceptivos hiperalgésicos y alodínicos (Le Bars et al., 2001; Muley et al., 2016).

Existen una gran variedad de modelos de dolor de tipo nociceptivo inflamatorio, a continuación se describirán algunos de los más utilizados para la bioevaluación de compuestos bioactivos.

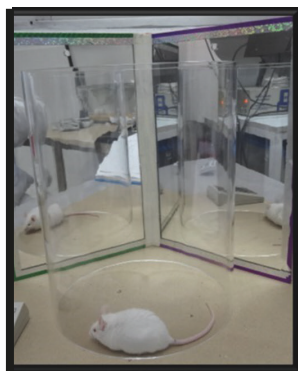
- Prueba de la formalina
- Prueba de estiramiento abdominal
- Modelo experimental PIFIR
- Modelo nociceptivo inflamatorio con el adyuvante completo de Freund

- Modelo nociceptivo inflamatorio con carragenina

Prueba de la formalina

La prueba de la formalina es la más utilizada como modelo de nocicepción inflamatoria, y se tienen algunas variaciones metodológicas para establecer procesos agudos o crónicos (Le Bars et al., 2001). El método consiste en colocar al animal en un cilindro de acrílico para que se ambiente durante 30 min, si se utiliza ratón, y 60 min si se utiliza rata; se pueden utilizar espejos detrás del cilindro para facilitar la visión de la conducta (Figura 4). La evaluación consiste en administrar el algésico en la superficie dorsal de la pata derecha del animal (que se conoce como ipsilateral), en un volumen no mayor a 20 μL en el caso del ratón y 50 μL en el caso de la rata.

Si se requiere activar un proceso nociceptivo inflamatorio del trigémino, se selecciona la zona orofacial del animal (Figura 4). Éste se regresa al cilindro de acrílico inmediatamente después de que se administra la formalina, y se observa la conducta nocifensiva, la cual se manifiesta mediante sacudidas de la pata a la que se administró formalina; en el caso del ratón también



Periodo de ambientación



Inyección orofacial



Inyección de la superficie dorsal de la pata

Figura 4. Prueba de la formalina. La formalina puede inyectarse a diferentes concentraciones (20 μL , 1–5 %), en la superficie dorsal de la pata ipsilateral o en la zona orofacial del ratón. Se recomienda que antes de la administración de formalina se deje al animal un periodo de ambientación de 30 a 60 min, al emplear ratones y ratas respectivamente. El efecto nociceptivo se cuantifica mediante el número de sacudidas de pata inyectada con formalina.

se puede contar la conducta de lamida de pata. Si se utilizan ratas, se cuenta un min cada cinco min durante una hora; en el caso de ratones, se cuentan 5 min continuos hasta completar 30 min. Para establecer el perfil nociceptivo, se realizan gráficas de tiempo vs. a la conducta (número de sacudidas o tiempo de lamida) (Tjølsen et al., 1992).

Prueba de estiramiento abdominal

El modelo de estiramiento abdominal es ampliamente utilizado para evaluar el efecto antinociceptivo de compuestos que estén relacionados con el sistema nervioso entérico. Este modelo puede realizarse en ratas o ratones, y consiste en administrar una sustancia irritante por vía intraperitoneal, que puede ser ácido acético, serotonina, capsaicina, entre otros algésicos. El animal se coloca en una caja de acrílico para contar la conducta nocifensiva, caracterizada por el número de contorsiones abdominales que se presentan en el ratón o rata durante 30 minutos (Le Bars et al., 2001).

Para ejemplificar estos modelos se describirá un experimento del efecto antinociceptivo de tramadol. El objetivo fue determinar si el efecto antinociceptivo de tramadol está mediado por los receptores opioides de tipo μ . Como metodología se utilizaron dos modelos de nocicepción de tipo inflamatorio, la prueba de la formalina y de estiramiento abdominal. Se utilizó un bloque de tres grupos de ratones, cada uno de seis animales. Al primer grupo se le administró vehículo (solución salina 0.9 %); al segundo grupo se le administró tramadol (30 mg/kg) por vía intraperitoneal; y al tercer grupo se le administró un pretratamiento con naloxona (antagonista de los receptores opioides, 1 mg/kg i.p.) y 15 min después tramadol (30 mg/kg, i.p.). Todos los ratones fueron administrados 15 min después de la administración de vehículo o tramadol, con formalina 1 % en la superficie plantar de la pata derecha, inmediatamente después se contó la conducta nociceptiva caracterizada por el número de sacudidas cada cinco min hasta completar 30 min.

En otro bloque de experimentos constituido por tres grupos con seis ratones, en cada grupo se siguió el mismo diseño de administración que en el bloque 1. Todos los ratones fueron administrados 15 min después de la administración de vehículo o tramadol, con ácido acético 0.6 % por vía intra-

peritoneal, inmediatamente después se contó la conducta nocifensiva caracterizada por el número de contorsiones cada cinco min hasta completar 30 min.

En la Figura 5 se muestra el curso temporal del efecto nociceptivo generado por la administración de formalina en el grupo vehículo, la conducta se presenta como una respuesta bifásica. La fase I comprende la conducta de 0 – 10 min, luego se presenta un periodo de quiescencia en donde no hay respuesta; y después se incrementa la conducta gradualmente de 10 – 30 min, lo que se conoce como fase II (Tjølsen *et al.*, 1992). En esa misma gráfica se observa que la administración de tramadol disminuye el número de sacudidas, tanto en fase I como en fase II.

En el grupo tres se administró naloxona (un antagonista de los receptores opioides tipo μ) previamente a la administración de tramadol, y se observa que la naloxona ocupa los receptores opioides y no permite que el tramadol disminuya el número de sacudidas, por lo que el efecto antinociceptivo del tramadol es revertido por naloxona, y se observa muy semejante al grupo con vehículo. En la Figura 5 se puede observar el curso temporal del efecto nociceptivo que

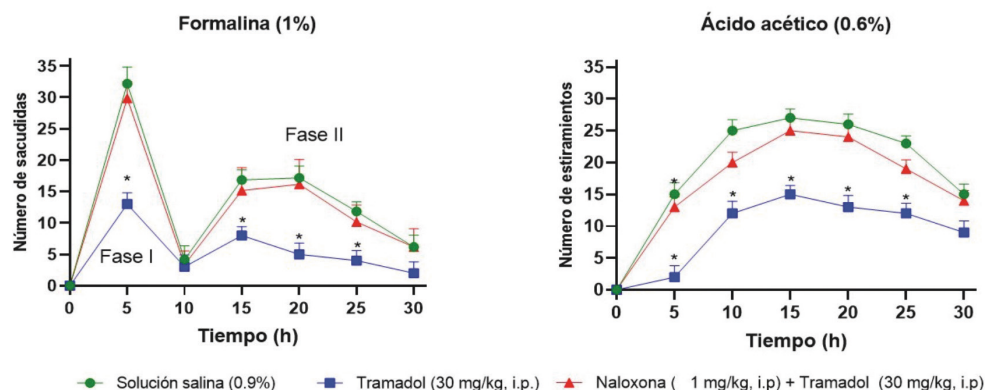


Figura 5. Cursos temporales del efecto antinociceptivo de tramadol en modelos de nocicepción inflamatorio. El tramadol (30 mg/kg, i.p.) y el vehículo (solución salina 0.9 %) fueron administrados en ratones ICR, 15 min antes del estímulo algésico (formalina 1%, 20 μ L/pata o ácido acético 0.6 %, i.p.). La naloxona (1 mg/kg, i.p.) fue administrada 15 min antes que el tramadol. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM de 6 animales. * Diferencia estadísticamente significativa vs. vehículo (ANOVA una vía; *post-hoc* Dunnett, $p \leq 0.05$).

se produce al grupo vehículo, y el efecto antinociceptivo de tramadol después de la administración de ácido acético 0.6 % (0.1 ml/10 g). También se observa como el pre-tratamiento con naloxona revierte el efecto de tramadol.

En este experimento se demuestra que el tramadol tiene su efecto antinociceptivo, a través de los receptores opioides de tipo μ , en dos modelos de nocicepción de tipo inflamatorio.

Modelo experimental PIFIR

Para semejar un proceso inflamatorio de tipo artrítico, en México se desarrolló un modelo de pérdida de la funcionalidad de la pata, que por sus siglas en inglés (“Pain-induced Functional Impairment”) se conoce comúnmente como PIFIR. El modelo fue desarrollado por primera vez en perro y posteriormente se implementó en rata. Se determinó que la inyección de ácido úrico (50 μ l al 30 % suspendido en aceite mineral) en la articulación fémur-tibio-rotular, ocasiona la pérdida gradual de funcionalidad en aproximadamente dos horas, y la conducta nocifensiva observada es el resguardo de la pata (Figura 6).

Para determinar la funcionalidad de la pata inflamada, se coloca a las ratas en un tambor de acero inoxidable con una malla metálica que gira a cuatro rpm. Para el registro de la recuperación de la funcionalidad de la pata, se utilizan electrodos pegados en las patas del animal, los cuales al hacer contacto con el cilindro metálico envían una señal a una computadora que registra el tiempo de permanencia de la pata afuncional; el registro se realiza durante un min cada 30 min (Figura 6). El índice de funcionalidad representa el efecto nociceptivo. Para determinar este parámetro se divide el tiempo de contacto de la pata afuncional (pata derecha con ácido úrico), entre el tiempo correspondiente a la pata funcional (pata izquierda sin ácido úrico) y se multiplica por 100 (Granados-Soto et al., 1993).

A diferencia de otros modelos de nocicepción inflamatoria, en este modelo se administran los tratamientos una vez que la nocicepción está instalada en el organismo. En los modelos algésicos con sustancias irritantes, los tratamientos se administran previamente a la inyección de formalina o ácido acético, entonces los tratamientos previenen la instalación del daño inflamatorio.

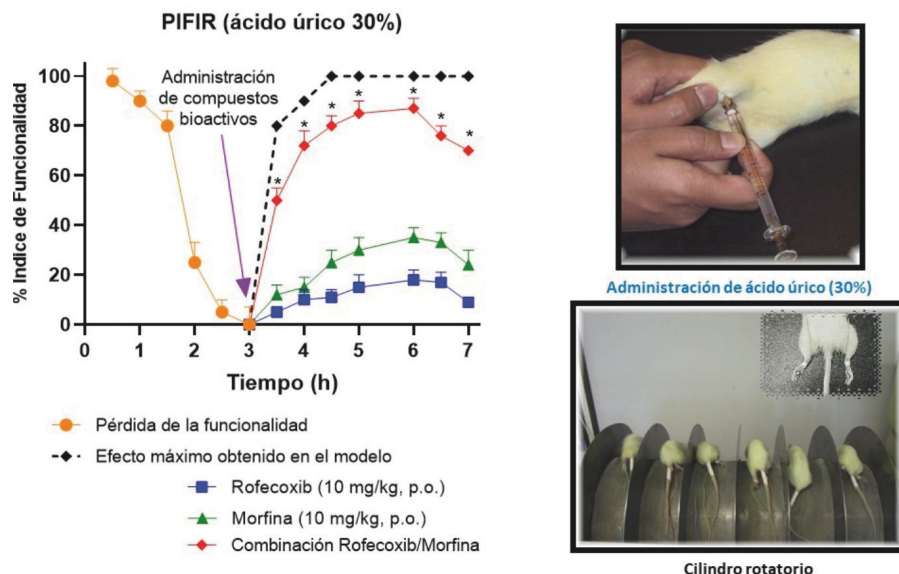


Figura 6. Cursos temporales del efecto antinociceptivo de rofecoxib (10 mg/kg, p.o.), morfina (10 mg/kg, p.o.) y su combinación en el modelo PIFIR, en ratas Wistar. La funcionalidad de la pata disminuye después de la inyección de ácido úrico (30 % en aceite mineral), la línea punteada representa el máximo efecto que se puede obtener en el modelo, con un compuesto bioactivo que ocasione el 100 % de la recuperación de la funcionalidad. La funcionalidad se registra haciendo girar el cilindro metálico a cuatro rpm, durante un minuto cada 30 min. Cada punto representa el promedio $\pm$ error estándar medio de seis animales. * Diferencia estadísticamente significativa vs. a la administración de los compuestos individuales (ANOVA dos vías; *post-hoc* Tukey, $p \leq 0.05$).

La ventaja del modelo PIFIR es que se puede evaluar el efecto de los compuestos bioactivos, una vez que está instalada la conducta nociceptiva.

En la Figura 6 se muestra la evaluación de una combinación de fármacos en el modelo PIFIR. El objetivo es determinar el tipo de interacción farmacológica que presenta la coadministración de morfina y rofecoxib, un AINE's selectivo para la isoforma de ciclooxygenasa 2. El método que se siguió fue el siguiente: se inyectó ácido úrico al 30 % en la articulación fémur-tibio-rotular de la extremidad inferior derecha de 18 ratas. Una vez que alcanzaron un índice de funcionalidad de cero, a un grupo de seis ratas se le administró por vía oral morfina (10 mg/kg); a otro grupo de seis ratas, rofecoxib (10 mg/kg); y al tercer grupo, la combinación de morfina + rofecoxib (10 + 10 mg/kg).

Posteriormente, se determina la funcionalidad de la pata de la rata, un min cada 30 min hasta completar cuatro horas de evaluación.

En el curso temporal de la Figura 6, se observa que la pérdida gradual de la funcionalidad de las ratas se presenta entre 2.5 y 3 h. Una vez que está establecido el daño y que se administraron los tratamientos, se observa que tanto rofecoxib como morfina (10 mg/kg, p.o.) administrados de forma individual tienen baja eficacia antinociceptiva, pues la recuperación de la funcionalidad es limitada (más en rofecoxib que en morfina). Sin embargo, cuando se administran en combinación, se observa un incremento de la funcionalidad aproximadamente al 80 %, con respecto al efecto máximo del modelo. Entonces, la administración de rofecoxib + morfina genera una interacción de tipo potenciación en el modelo experimental PIFIR.

Modelo nociceptivo inflamatorio con el adyuvante completo de Freund

Otro modelo que semeja un proceso nociceptivo inflamatorio de tipo artritis, es la prueba de adyuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis* en vehículo de aceite mineral), el cual también se administra en la articulación fémur-tibio-rotular de la pata derecha de la rata. Se necesitan varios días para que se produzca el proceso inflamatorio significativo en la pata administrada, lo que ocasiona una disminución de la movilidad de la pata inflamada (arreflexia). Con un micrómetro se puede medir la inflamación de la pata, y después de la administración de compuestos bioactivos este valor debe disminuir.

El porcentaje de arreflexia se obtiene utilizando como referencia la pata de la rata no administrada. Debido a que el animal tiene una inflamación exacerbada disminuye su capacidad para soportar el peso, así que otra medida que se puede utilizar es mediante una prueba de incapacitancia, en donde un equipo especializado (*Linton Instrumentation, Norfolk, Reino Unido*) determina el nivel de inmovilidad. El equipo detecta la distribución de peso corporal de cada una de las patas de la rata mediante sensores, y la nocicepción se expresa como porcentaje de soporte de peso contralateral (no inflamado), con valores del 100 % resultantes de una distribución de peso igual en ambas extremidades. Con la administración del adyuvante de Freund, también se puede utilizar el modelo de cojinete de peso dinámico (*Dynamic weight Bearing*) (Coderre y Laferrière, 2020).

Modelo nociceptivo inflamatorio con carragenina

La carragenina Tipo IV, Lambda, es una sustancia inflamatoria que se inyecta en el cojinete plantar de la rata (50 μ l de 10 mg/mL en solución salina) o ratón (20 μ l de 10 mg/mL en solución salina), para producir un fenómeno inflamatorio que se puede evaluar por al menos seis horas; existen algunas modificaciones en que la administración de carragenina se evalúa de manera crónica durante varios días. En presencia del fenómeno inflamatorio, se puede determinar la hiperalgesia al utilizar una prueba de latencia térmica o mecánica, como se describió previamente en los modelos no patológicos (placa caliente). También se puede utilizar un pletismómetro, para establecer el grado de inflamación mediante desplazamiento de volumen de la pata con edema por administración de carragenina. Las mediciones se realizan antes y después de la administración de compuestos bioactivos, la disminución del volumen representa un efecto antiinflamatorio (Morris, 2003).

10.4.3 Modelos de nocicepción de tipo neuropática

El dolor neuropático periférico tiene varias etiologías, puede ser ocasionado por un daño directo al nervio, cambios metabólicos (hiperglucemia), inflamación y sustancias neurotóxicas, entre otros. Debido a que la etiología del dolor neuropático es compleja, no se puede tener un modelo único que incluya todos los mecanismos involucrados, entonces los modelos que se han generado tratan de representar las diferentes manifestaciones que se presentan en el humano.

La hipersensibilidad generada mediante una lesión, daño o interrupción de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en las neuronas sensoriales primarias, es lo que caracteriza al dolor neuropático. Uno de los modelos más utilizados es el de constricción crónica (modelo de Bennett), en el cual se realiza una ligadura unilateral del nervio ciático a nivel de la fosa poplítea. La cirugía se realiza bajo anestesia de ketamina/xilazina (45/12 mg/kg, i.p.), se hace una incisión de 1.5 cm por debajo de la pelvis, luego el bíceps femoral y se expone el nervio ciático izquierdo localizado en la mitad a nivel del muslo. Se hacen cuatro ligaduras no muy apretadas con un mm de espacio entre ellas y se sutura la incisión.

Una vez que se recupera la rata, es importante visualizar que al día siguiente no se presente autotomía. Esta cirugía permite en un lapso de entre ocho y 12 días, aproximadamente, el desarrollo de hipersensibilidad que se puede evaluar en una prueba térmica (frío o calor); los animales también pueden presentar una conducta de resguardo que se puede cuantificar o evaluar en un modelo de incapacitación, y también se puede evaluar hiperalgesia mecánica con los filamentos de Von Frey (Jaggi *et al.*, 2011).

En otros modelos se administran sustancias neurotóxicas que generan el desarrollo de alodinia e hiperalgesia; por ejemplo, la estreptozotocina (150 mg/kg, i.p.) genera hiperglucemia en la rata, y entre cuatro a seis semanas desarrolla alodinia e hiperalgesia. En este modelo se utiliza nicotinamida (50 mg/kg, i.p.), para evitar el deterioro fisiológico del animal (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2017). La evaluación de alodinia e hiperalgesia mecánica en estos animales, puede realizarse con los filamentos de Von Frey y el modelo de Randall-Sellito.

Otro modelo de neuropatía es la ligadura de los nervios lumbares L5 y L6; dos días después de la cirugía se genera alodinia y ésta se mantiene durante cuatro a seis semanas. Estos modelos son de utilidad para evaluar alodinia en pruebas térmicas de frío y calor, así como alodinia mecánica. Se trata de una microcirugía en los nervios L5 y L6, los cuales se ligan unilateralmente justo proximal a los cuerpos vertebrales (Chung *et al.*, 2004). La cirugía se realiza bajo un microscopio de disección con una distancia focal larga. El animal se coloca en una zona quirúrgica y se realiza una incisión longitudinal (unos 2.5 cm en longitud y 5 mm lateral desde la línea media) en la parte lumbar inferior y niveles sacros, exponiendo los músculos paraespinales del lado izquierdo. La localización de la incisión está determinada por la posición de la apófisis espinosa L5, que se encuentra al nivel del extremo rostral de la cresta ilíaca.

En los músculos paraespinales se extrae el nervio L5 hasta el sacro. L6 se ubica en un proceso transversal que cubre las ramas ventrales de los nervios espinales L4 y L5. L5 izquierdo se expone y se liga con sutura de seda 4 – 0 a 6 – 0 distal al ganglio de la raíz dorsal. Después de eso, L6 también se encuentra y se liga. Es importante realizar un grupo control en el cual se realice el procedimiento quirúrgico, pero no se ligue el nervio, con

la finalidad de garantizar que el procedimiento no interfiere con la presencia de hipersensibilidad (este grupo se conoce como Sham). Después se sutura al animal y se espera su recuperación de siete a 10 días, los animales que presentan discapacidad motora son eliminados del estudio (Chung et al., 2004).

Evaluación de alodinia e hiperalgesia

La alodinia y la hiperalgesia se puede generar mediante la administración de sustancias irritantes como acetona, capsaicina [10 – 50 µL al 0.03–0.3 % en Tween 80 (10 %), alcohol (10 %) y solución salina (0.9 %)] y formalina (1–5 %) inyectadas en la pata trasera de los roedores. La inyección de formalina genera un efecto de nocicepción inflamatoria de corta duración, sin embargo, a las 24 horas de la inyección se induce alodinia e hiperalgesia en sitios secundarios; este efecto nociceptivo perdura hasta el día seis, e incluso se puede evaluar de tres a cuatro semanas después. En ambos casos, para evaluar la conducta de hiperalgesia y alodinia, se emplean métodos mecánicos como los filamentos de Von Frey.

Estos últimos son un sistema de monofilamentos calibrados para suministrar una fuerza desde 0.008 g hasta 300 g. Las ratas se colocan en cajas de acrílico sobre una malla metálica, de tal forma que se tenga acceso a la superficie plantar del animal. Es importante que éstos tengan un periodo de habituación de al menos 20–30 min, con la finalidad de que disminuyan su conducta exploratoria y evitar falsos resultados. Entonces, se coloca la punta de la fibra de longitud y diámetro determinado en la parte media de la superficie plantar, evitando los puntos menos sensibles (almohadillas plantares), presionando la piel en ángulo recto, la fuerza de aplicación aumenta a medida que se presiona hasta que el filamento se curva y se mantiene durante 6 – 8 segundos. La respuesta de retiro de la pata del filamento se traduce como una respuesta positiva (x); y si no hay retiro, como una respuesta negativa (0).

Una técnica ampliamente utilizada es la determinación del 50 % del umbral de retiro de la pata, mediante el método ascendente-descendente “Up & Down” (Dixon, 1980). Los filamentos en un rango de 0.4 g a 0.15 g se utilizan de acuerdo con la respuesta que se vaya generando. Se inicia con el filamen-

to de 2 g: si el animal presenta una respuesta positiva, entonces se utiliza un filamento de menor calibre; si hay otra respuesta positiva, se continúa con otro filamento menor; en caso contrario, una respuesta negativa indica que hay que continuar con el filamento de mayor peso. A partir del primer cambio en el patrón de respuestas (de “0” a “x” o viceversa), se realizan cuatro evaluaciones adicionales para tener una serie de seis valores. El 50 % del umbral de retiro se obtiene con la siguiente fórmula:

$$50 \% \text{ Umbral (g)} = (10^{[Xf + k\delta]}) / 10,000$$

Donde:

- Xf: Valor del último filamento de Von Frey utilizado (en unidades logarítmicas).
- K: Factor de corrección indicado en la tabla publicada por Dixon (1980), para el patrón de respuestas positivas y/o negativas obtenidas en la prueba.
- δ: Diferencia de media entre el patrón de respuestas obtenido (unidades logarítmicas).

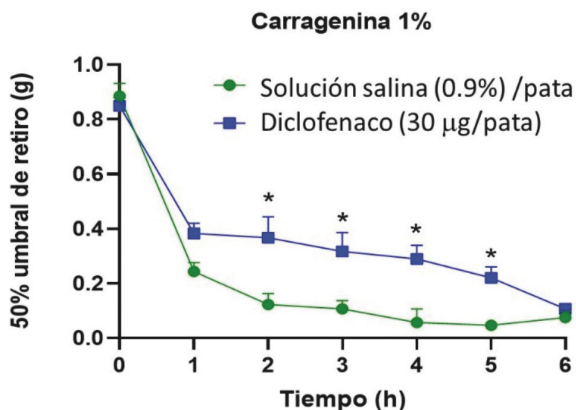


Figura 7. Curso temporal del efecto antialodínico de diclofenaco (30 mg/pata). El efecto de diclofenaco se evaluó seis horas posteriores a la administración intraplantar de carragenina 1 %, administrada en la pata inferior derecha. Se utilizaron los filamentos de Von Frey para establecer el umbral de retiro. Cada punto representa el promedio $\pm$ error estándar medio de seis ratones. El asterisco representa una diferencia significativa con respecto a la administración de vehículo (Prueba T-Student, $p \leq 0.05$).

El 50 % del umbral de retiro se interpreta como la intensidad de estímulo requerido, para provocar una respuesta positiva en el 50 % de las aplicaciones de estímulos.

En la Figura 7, se muestra la evaluación del efecto antialodínico de diclofenaco. El objetivo fue demostrar este efecto, en un modelo de dolor de tipo neuropático inducido por carragenina. El método que se utilizó fue el siguiente: A un grupo de seis ratones se les administró carragenina al 1 %, y se evaluó la alodinia mecánica cada hora durante seis horas. A otro grupo de ratones se les administró diclofenaco (30 mg/pata) 15 min antes de administrar carragenina 1 %, y se midió la alodinia mecánica durante seis horas. Se realizó un curso temporal, el tiempo de evaluación vs. al efecto determinado como 50 % de umbral de retiro. En la Figura 7 se observa que los animales con carragenina disminuyen el umbral de retiro, y que la administración de diclofenaco ocasiona un aumento del umbral de retiro. Por lo que el diclofenaco tiene efecto antialodínico en un modelo de dolor neuropático inducido por carragenina.

Conclusiones

Existe una gran variedad de modelos experimentales de nocicepción, la selección de éstos depende del tipo de dolor que se desea evaluar, y del tipo de compuesto bioactivo de origen sintético y/o natural. Es importante considerar que los estímulos repetidos pueden generar un falso positivo o falso negativo, debido a la habituación que se genera sobre todo a los estímulos térmicos. Por lo anterior, los animales solo pueden utilizarse una sola vez. Además se sugiere observar la conducta normal de los animales, con la finalidad de detectar el cambio en éstos ante la presencia de estímulos nocivos. Se debe considerar que si bien un compuesto puede ser inactivo en un modelo, es posible que en otro sí tenga un efecto antinociceptivo.

Referencias

Bannon, A. W. y Malmberg, A. B. (2007). Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* Capítulo 8: Unidad 8.9. doi: 10.1002/0471142301.ns0809s41.

CEFEN (Comité de Estudios Feto-Neonatales) (2019). *Grupo de Trabajo de Dolor en Neonatología*. (<https://www.sap.org.ar/institucional/comites-nacionales/4/estudios-fetoneonatales-cefen.html>).

Chung, J. M., Kim, H. K., Chung, K. (2004). Segmental spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Methods in Molecular Medicine*, 99: 35-45. doi: 10.1385/1-59259-770-X:035.

Coderre, T. J. y Laferrière, A. (2020). The emergence of animal models of chronic pain and logistical and methodological issues concerning their use. *Journal of Neural Transmission* (Vienna), 127(4): 393-406. doi: 10.1007/s00702-019-02103-y.

Déciga-Campos, M. y Ortiz-Andrade, R. (2015). Enhancement of antihyperalgesia by the coadministration of N-palmitoylethanolamide and acetaminophen in diabetic rats. *Drug Dev. Res.*, 76(5): 228-234. doi: 10.1002/ddr.21259.

Déciga-Campos, M., Beltrán-Villalobos, K. L., Aguilar-Mariscal, H., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Ventura-Martínez, R. (2021a). Synergistic herb-herb interaction of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Syzygium aromaticum* and *Rosmarinus officinalis* combination. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2021: 8916618. doi: 10.1155/2021/8916618.

Déciga-Campos, M., Villafán-Gutiérrez, R., Espinosa-Juárez, J. V., Jaramillo-Morales, O. A., López-Muñoz, F. J. (2021b). Synergistic interaction between haloperidol and gabapentin in a model of neuropathic nociception in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 891: 173702. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173702.

Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20: 441-462. doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301.

Douglas, J. M., Sánchez-Migallón Guzmán, D., Paul-Murphy, J. R. (2018). Pain in birds: The anatomical and physiological basis. *The Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice*, 21(1): 17-31. doi: 10.1016/j.cvex.2017.08.008.

Granados-Soto, V., López-Muñoz, F. J., Castañeda-Hernández, G., Salazar, L. A., Villarreal, J. E., Flores-Murrieta, F. J. (1993). Characterization of the analgesic effect of paracetamol and caffeine combinations in the pain-induced

functional impairment model in the rat. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45(7): 627-631. doi: 10.1111/j.2042-7158.1993.tb05666.x.

Grupo de Trabajo de Dolor en Neonatología, Comité de Estudios Feto-Neonatales (CEFEN) (2019). Pain management in Neonatology. *Archivos Latino-americanos de Pediatría*, 117(5): S180-S19. doi: 10.5546/aap.2019.S180.

Hamamoto, D. T. y Simone, D. A. (2003). Characterization of cutaneous primary afferent fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. *Journal of Neurophysiology*, 90(2): 566-577. doi: 10.1152/jn.00324.2003.

IASP (2020). *Definición revisada de la traducción de dolor*. Consultado en: (<https://s3.amazonaws.com/rdcmsiasp/files/production/public/Staff/Revised%20Definition%20of%20Pain%20Translations%20%282020%29.pdf>), recuperado el 22 de julio de 2021.

Jaggi, A. S., Jain, V., Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25(1): 1-28. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.

Latremoliere, A. y Woolf, C. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9): 895-926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012. Review.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev. Dec.*, 53(4): 597-652.

Lo, J., Chan., L., Flynn, S. (2021). Systematic review of the incidence, prevalence, costs, and activity and work limitations of amputation, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, back pain, multiple sclerosis, spinal cord injury, stroke, and traumatic brain injury in the United States: A 2019 Update. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 102 (1): 115-131. (<https://doi: 10.1016/j.apmr.2020.04.001>).

Malafoglia, V., Bryant, B., Raffaelli, W., Giordano, A., Bellipanni, G. (2013). The zebrafish as a model for nociception studies. *Journal of Cellular Physiology*, 228(10): 1956-1966. doi: 10.1002/jcp.24379.

Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P., Woutersen, R. A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol. Pathol.* 39(5): 759-775. doi: 10.1177/0192623311409597.

Morris, C. J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, 225: 115-121. doi: 10.1385/1-59259-374-7:115.

Mould-Quevedo, J., Peláez-Ballestas, I., Vázquez-Mellado, J., Terán-Estrada, L., Esquivel-Valerio, J., Ventura-Ríos, L., Aceves-Ávila, F. J., Bernard-Medina, A. G., Goycochea-Robles, M. V., Hernández-Garduño, A., Burgos-Vargas, R., Shumski, C., Garza-Elizondo, M., Ramos-Remus, C., Espinoza-Villalpando, J., Álvarez-Hernández, E., Flores-Alvarado, D., Rodríguez-Amado, J., Casasola-Vargas, J., Skinner-Taylor, C.; Grupo REUMAIMPACT (2008). Social costs of the most common inflammatory rheumatic diseases in Mexico from the patient's perspective. *Gac. Med. Mex.*, 144(3): 225-231.

Muley, M. M., Krustev, E., McDougall, J. J. (2016). Preclinical assessment of inflammatory pain. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 22(2): 88-101. doi: 10.1111/cns.12486.

Ovalle-Magallanes, B., Déciga-Campos, M., Mata, R. (2017). Antihyperalgesic activity of a mexicanolide isolated from *Swietenia humilis* extract in nicotinamide-streptozotocin hyperglycemic mice. *Biomed. Pharmacother.*, 92: 324-330. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.073.

Peláez-Ballestas, I., Sanin, L. H., Moreno-Montoya, J., Álvarez-Nemegyei, J., Burgos-Vargas, R., Garza-Elizondo, M., Rodríguez-Amado, J., Goycochea-Robles, M. V., Madariaga, M., Zamudio, J., Santana, N., Cardiel, M. H.; Grupo de Estudio Epidemiológico de Enfermedades Músculo Articulares (GEEMA) (2011). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J. Rheumatol. Suppl.*, 86: 3-8. doi: 10.3899/jrheum.100951.

Quiñonez-Bastidas, G. N. y Navarrete, A. (2021). Mexican plants and derivatives compounds as alternative for inflammatory and neuropathic pain treatment. A review. *Plants (Basel)*, 10(5): 865. doi: 10.3390/plants10050865.

Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain. Definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9): 1976-1982. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001939.

Reaves, B. J. y Wolstenholme, A. J. (2007). The TRP channel superfamily: insights into how structure, protein-lipid interactions and localization influence function. *Biochem. Soc. Trans.*, 35(Pt. 1): 77-80. doi: 10.1042/BST0350077.

Smith, E. S., Omerbašić, D., Lechner, S. G., Anirudhan, G., Lapatsina, L., Lewin, G. R. (2011). The molecular basis of acid insensitivity in the African naked mole-rat. *Science*, 16; 334(6062): 1557-1560. doi: 10.1126/science.1213760.

Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A., Gentle, M. J. (2003). Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 7; 270(1520): 1115-1121. doi: 10.1098/rspb.2003.2349.

Sneddon, L. U. (2018). Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology*, (Bethesda), 1; 33(1): 63-73. doi: 10.1152/physiol.00022.2017.

Stevens, C. W., Brasel, C. M., Shekher, M. (2007). Cloning and bioinformatics of amphibian mu, delta, kappa, and nociceptin opioid receptors expressed in brain tissue: evidence for opioid receptor divergence in mammals. *Neuroscience Letters*, 4; 419(3): 189-194. doi:10.1016/j.neulet.2007.04.014.

Terashima, S. y Liang, Y. (1994). C mechanical nociceptive neurons in the crotaline trigeminal ganglia. *Neuroscience Letters*, 26; 179(1-2): 33-36. doi: 10.1016/0304-3940(94)90928-8.

Tjølsen, A., Berge, O., Hunskaar, S., Rosland, J. H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1): 5-17. doi: 10.1016/0304-3959(92)90003-T.

Tomohiro, D., Mizuta, K., Fujita, T., Nishikubo, Y., Kumamoto, E. (2013). Inhibition by capsaicin and its related vanilloids of compound action potentials in frog sciatic nerves. *Life Sciences*, Mar 14; 92(6-7): 368-378. doi: 10.1016/j.lfs.2013.01.011.

Yam, M. F., Loh, Y. C., Oo, C. W., Basir, R. (2020). Overview of neurological mechanism of pain profile used for animal “pain-like” behavioral study with proposed analgesic pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(12): 4355. doi: 10.3390/ijms21124355.

Capítulo 11.

Modelos *in vitro* para la bioevaluación de nuevos agentes antibacterianos

Ángel de Jesús Dzul-Beh*
Andrés Humberto Uc-Cachón*
Gloria María Molina Salinas*

* Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Yucatán, México.

11.1 Generalidades

Las enfermedades infecciosas representan un importante problema de salud pública. Entre los factores que contribuyen a la prevalencia de estas infecciones, se encuentra el desarrollo y la propagación de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Aljeldah, 2022), particularmente desde bacterias (Murray et al., 2022). La RAM ocurre cuando los microorganismos pueden sobrevivir en presencia de concentraciones de fármacos que normalmente inhiben su crecimiento o los matan. Esta resistencia frente a determinado fármaco puede ser intrínseca o adquirida. La primera es una propiedad natural de cada grupo bacteriano, mientras que la segunda es un rasgo que está en función directa de la variabilidad genética bacteriana, y que puede deberse a mutación o adquisición de material genético (Ferri et al., 2017; Reygaert, 2018).

El desarrollo de agentes antimicrobianos que inició con el descubrimiento de la penicilina por Fleming (Vanegas-Múnera y Jiménez-Quiceno, 2020) y la inmunoterapia en las últimas décadas del siglo pasado, parecían sugerir que se alcanzaría el control de estas enfermedades. Sin embargo, no pasó mucho tiempo y los fármacos empezaron a perder su eficacia debido a la resistencia. La RAM es una consecuencia esperada en la adaptación evolutiva de los patógenos bacterianos a estos agentes nocivos, sin embargo, ha sido acelerada principalmente por el mal manejo y la terapia inadecuada, así como por el abuso en el consumo de antimicrobianos sin supervisión médica (Uc-Cachón et al., 2019). En la actualidad la RAM continúa afectando a millones de personas, sobre todo en países con recursos limitados (García-Palomo et al., 2010).

Por otro lado, a pesar de la aparente disminución de su prevalencia, han ido reemergiendo enfermedades que se creían controladas o erradicadas, al mismo tiempo que han surgido nuevas infecciones causadas principalmente por agentes como virus y bacterias, entre los que destacan, el virus de la inmunodeficiencia humana, SARS-CoV-1, virus de la gripe A H5N1 o H1N1, recientemente SARS-CoV-2 (Huremović, 2019) e inclusive microorganismos resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos disponibles, que en la actualidad son conocidos como *superbugs* (Christaki et al., 2019; Trovato et al., 2020).

A través de la historia de la humanidad, las enfermedades infecciosas han sido la mayor causa de sufrimiento en términos de morbilidad y mortalidad (Bloom y Cadarette, 2019). Su diseminación está asociada a las etapas de la civilización, con la domesticación de animales aparecen las enfermedades parasitarias y zoonóticas; los asentamientos y la urbanización conllevan al surgimiento de enfermedades bacterianas y virales transmitidas por aire (Lindahl y Grace, 2015). A través de los años, el ser humano ha sufrido grandes pandemias como la peste bubónica, viruela, cólera, influenza y actualmente COVID-19 (Zhu et al., 2020), pero también existen asesinos silenciosos causantes de infecciones crónicas como la tuberculosis y sífilis (Holmes et al., 2017).

Las bacterias son los agentes etiológicos que más frecuentemente causan infecciones (Straif-Bourgeois et al., 2014). Para causar enfermedad, los patógenos ingresan en el huésped a través de las mucosas o la piel, y se establecen en el nuevo sitio biológico conduciendo a la colonización, primera etapa de simbiosis para el microorganismo. La infección es la invasión y multiplicación del microorganismo en el hospedero, quien –dependiendo de factores como las características del microorganismo (patogenicidad o virulencia), concentración del germen y las defensas del huésped– desarrollará una enfermedad infecciosa, subclínica o de convivencia. Las infecciones se clasifican, con respecto al entorno de adquisición, como comunitarias cuando se presentan de forma espontánea, sin relacionarse con procedimientos médicos, y por bacterias habituales; y como asociadas a la atención de la salud (IAAS), cuando surgen en el entorno hospitalario, ya que no estaban presentes ni en incubación previo al ingreso (García-Palomo et al., 2010).

11.2 Epidemiología

A pesar del progreso en las ciencias de la salud, la morbi-mortalidad de las enfermedades infecciosas se ha disparado en las recientes décadas, y las bacterianas no son la excepción (Straif-Bourgeois et al., 2014). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2016, se estimaron 376 millones de nuevas infecciones a nivel mundial, una de cada cuatro de transmisión sexual, siendo las más prevalentes las bacterianas: clamidiasis, gonorrea y sífilis con 127, 87 y 6.3 millones de nuevos casos, respectivamen-

te (WHO, 2019 [página web]). En el 2019 se estimaron 10 millones de personas con tuberculosis, primera causa de muerte entre las enfermedades infecciosas, con cerca de 4 mil defunciones al día (WHO, 2020 [página web]). Además, se han estimado de 1.3 a 4 millones de nuevos casos de cólera y de 21 mil a 143 mil muertes (WHO, 2021a [página web]).

Desde la 68ª Asamblea Mundial de la Salud (2015), se implementó el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System), con el objetivo de concentrar datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio de los agentes patógenos que representan las mayores amenazas para la salud pública mundial, y favorecer el intercambio de datos sobre la resistencia a los fármacos antimicrobianos entre los países miembros (WHO, 2021b [página web]).

Acorde con lo anterior, el Centro para Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) reportó las prevalencias de los microorganismos causantes de IAAS en 4403 hospitales, identificando a *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (CDC, 2018 [página web]).

En su reporte epidemiológico anual del 2019 sobre resistencia a los antimicrobianos, el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) identificó a los patógenos *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* como los más prevalentes (ECDC, 2021 [página web]). El PUCRA (Plan Universitario de Control de Resistencia Antibacteriana) de la Universidad Nacional Autónoma de México, reportó que los microorganismos más prevalentes en las infecciones en los hospitales de la red, durante 2018, fueron: a) los bacilos Gram-negativos: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, y b) los cocos Gram-positivos: *S. aureus* y *E. faecium* (Ponce de León, 2018).

Consistentemente los reportes científicos distinguen la alta prevalencia de las bacterias ESKAPE, conformado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Se utiliza este acrónimo para nombrarlas, debido a su capacidad de “escapar” de la acción biocida de los fármacos (Chávez-Jacobo, 2020). A este grupo se suma la *Escherichia coli*, que se distingue por su alta prevalencia y altas tasas de resistencia a fármacos. Las bacterias ESKAPE-E

representan nuevos paradigmas en la patogénesis, transmisión y RAM (De Oliveira et al., 2020; Santajit e Indrawattana, 2016).

Las infecciones causadas por las ESKAPE-E se documentan como comunitarias e IAAS; son de altas tasas de prevalencia y morbi-mortalidad. Su panorama epidemiológico se agrava por la presencia de cepas con resistencia a los tratamientos existentes y, por ende, un aumento en los costos de atención. Estos patógenos son especialmente peligrosos en los hospitales, ya que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales. Se estima que cerca de 700 mil personas mueren cada año, a causa de infecciones por patógenos resistentes, y se calcula que esta cifra podría alcanzar los 10 millones de muertes en el 2050 (O'Neill, 2016).

Por lo anterior, recientemente la OMS decretó a la RAM como uno de los principales problemas de siglo XXI (Tacconelli et al., 2018). Además, reportó un listado de patógenos («microorganismos de atención prioritaria con nivel crítico, alto y medio») como amenazas a la salud pública, por su alto potencial patógeno y su resistencia a los agentes antimicrobianos, con la finalidad de convocar a realizar investigación y desarrollo (I+D) sobre estos microorganismos y en la generación de nuevos fármacos, respectivamente. Encabezan la lista con prioridad crítica *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, resistentes a carbapenémicos; y *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *E. coli*, resistentes a carbapenémicos y productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE); seguidos con prioridad alta de atención *E. faecium*, resistente a vancomicina, y *S. aureus* resistente a metilcilina (WHO, 2017 [página web]).

Las ESKAPE-E han sido identificadas como los agentes causales de infecciones más prevalentes a lo largo y ancho de nuestro país. Datos recientes de estudios multicéntricos de la Secretaría de Salud (SS) y del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), mostraron que *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *A. baumannii* son los patógenos más prevalentes (Arias-Flores et al., 2016). En hospitales públicos y privados de la Ciudad de México, se identificaron a *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. aureus*, como los agentes infecciosos más prevalentes (Gutiérrez-Muñoz et al., 2017); *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*, en el Hospital Infantil de México (Coria-Lorenzo et al., 2017); *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* en el Hospital General del ISSSTE Durango (Galván-Meléndez et al., 2017); *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y

S. aureus para el Hospital de Alta Especialidad-Christus Muguerza de Monterrey (Cornejo-Avendaño y Ramírez-Rosales, 2012); *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* en el Hospital No. 48 IMSS Guanajuato (Duarte-Raya y Granados-Ramírez, 2012).

En Mérida, el Hospital Regional de Alta Especialidad de la SS reportó alta prevalencia de infecciones por *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* (Torres-Erazo et al., 2018). Nuestro grupo documentó la alta prevalencia de infecciones por *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *A. baumannii* en la Unidad Médica de Alta Especialidad, IMSS Yucatán (Uc-Cachón et al., 2019). Recientemente, se identificó que los agentes causales más frecuentes de infecciones en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología en la Ciudad de México, fueron *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *Klebsiella* spp. (De la Cruz-Hernández et al., 2019). Además, estas investigaciones documentan la tendencia creciente de la resistencia a fármacos en las bacterias Gram positivas y en las Gram negativas, resultando en el alarmante incremento de la falla terapéutica de los fármacos antimicrobianos asequibles.

11.3 Métodos de bioevaluación

Las pruebas clínicas de susceptibilidad a los antimicrobianos se pueden utilizar para el hallazgo y desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos, también son útiles en la epidemiología y la terapia. En este capítulo nos centramos en el uso de estos métodos de prueba para la evaluación *in vitro* de extractos, fracciones y compuestos puros naturales o sintéticos, como posibles agentes antibacterianos.

La era moderna de los antimicrobianos inició con el descubrimiento de la penicilina por Fleming (Sengupta et al., 2013). Sin embargo, no pasó mucho tiempo y los fármacos empezaron a perder su eficacia debido a la RAM, lo que ha conducido a la aparición de las superbacterias (Oldenkamp et al., 2021). Actualmente, los fracasos en el tratamiento asociado a superbacterias se ha convertido en una preocupación mundial para la salud pública (Ahmad y Khan, 2019). Por esta razón, el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antibacterianos es un objetivo de importancia crítica.

Los productos naturales (PN), también nombrados metabolitos secundarios, continúan siendo una de las principales fuentes de nuevas moléculas,

como posibles fármacos antimicrobianos (Bérdy, 2005); éstos se derivan de bacterias procariotas, microorganismos eucariotas, plantas y diversos organismos animales (Abdel-Razek et al., 2020). La mayor parte de los antimicrobianos descubiertos hasta ahora, son o se derivan principalmente desde cultivos microbianos y especies vegetales (Newman y Cragg, 2020).

Las plantas y otras fuentes naturales pueden proporcionar una amplia gama de compuestos con estructura química diversa y/o novedosa (Newman y Cragg, 2016). Por esta razón, varios grupos de investigación han centrado sus estudios en la investigación del potencial antibacteriano de extractos vegetales y microbianos, aceites esenciales y metabolitos secundarios puros (Balouiri et al., 2016; Guglielmi et al., 2020; Sharma et al., 2017; Uc-Cachón et al., 2021). De manera paralela, grupos de investigación en química sintética desarrollan nuevas moléculas con potencial acción sobre bacterias (El-Atawy et al., 2019; Vollaro et al., 2019). Además, se han desarrollado métodos eficientes y rápidos para la detección y/o cuantificación del efecto de extractos, fracciones o compuestos puros, para su posible aplicación como nuevos agentes antibacterianos, incluso sobre cepas resistentes a fármacos (Benkova et al., 2020).

Para evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de nuevos agentes, se pueden utilizar diversos métodos de laboratorio, inhibición del crecimiento (Weinstein et al., 2019), de enzimas vitales para el microbio (Liu et al., 2018). Inclusive se han descrito otros abordajes como son los modelos *in silico*, que permiten identificar dianas terapéuticas específicas (Svanberg-Frisinger et al., 2021; Kawsar et al., 2022). En este sentido, como primer abordaje del estudio sistemático de los PN y sintéticos, los ensayos de laboratorio más conocidos y básicos son los que exploran el efecto sobre el crecimiento bacteriano, difusión en disco, bioautografía y dilución en agar o caldo (Ríos et al., 1988; Balouiri et al., 2016).

Por todo lo anterior, a continuación se detallan las principales técnicas para evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de un extracto, fracción o un compuesto puro de origen natural o sintético.

11.3.1 Método de difusión en agar

Este ensayo fue desarrollado en 1940 para evaluar la susceptibilidad a la penicilina (Heatley, 1944), posteriormente, fue estandarizado e introducido en

los experimentos por Kirby y Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Esta prueba se considera el estándar de oro en los laboratorios de microbiología clínica, para evaluar la susceptibilidad a un fármaco antimicrobiano (Khan *et al.*, 2019).

Actualmente, se han publicado normas aceptadas y aprobadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, por sus siglas en inglés), para la evaluación de fármacos sobre bacterias y otros microorganismos, como levaduras. Sin embargo, no todas las bacterias existentes pueden ser estudiadas con precisión por este método (Humphries *et al.*, 2018; Matuschek *et al.*, 2014).

El método consiste en inocular placas de agar Müller-Hinton (90 mm de diámetro) con una suspensión bacteriana a una concentración estandarizada (estándar de McFarland 0.5). Los discos de papel (diámetro aproximado de seis mm) conteniendo el agente a evaluar se colocan sobre el agar previamente inoculado. Las placas de agar se incuban en condiciones adecuadas, por lo general durante 16 – 24 h a 37 °C. El efecto de los agentes se determina midiendo los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento microbiano (Figura 1) (Balouiri *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2019).

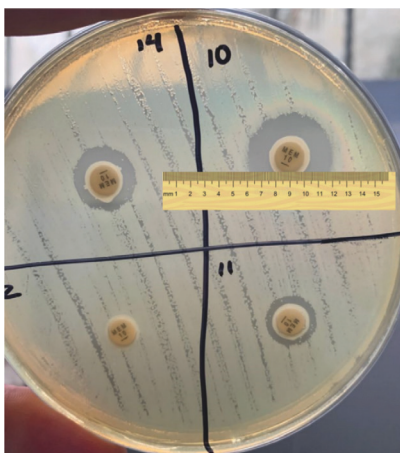


Figura 1. Representación del método de difusión en agar, para evaluar el efecto del agente impregnado en sensidisco, que se determina mediante la medición de halos de inhibición. La placa de agar muestra el efecto de antibióticos sobre crecimiento bacteriano de *S. aureus*. Fuente: Los autores.

El ensayo de difusión no es adecuado para evaluar la actividad antibacteriana de extractos, fracciones o compuestos que son escasamente solubles o insolubles en agua, ya que su naturaleza hidrofóbica limita su difusión uniforme a través del agar (Ríos et al., 1988; Mann y Markham, 1998). Por lo tanto, la ausencia de un halo de inhibición no significa que el agente es inactivo (Moreno et al., 2006). Tampoco es un método adecuado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), ya que no es posible cuantificar la cantidad del agente difundido en el agar. Sin embargo, el bioensayo posee ciertas ventajas sobre otros métodos, por ejemplo: simplicidad, bajo costo, capacidad para evaluar un gran número de agentes y facilidad para interpretar los resultados. Por lo que este método es ampliamente utilizado para el tamizaje antimicrobiano (Balouiri et al., 2016).

11.3.2 Bioautografía

Esta técnica fue establecida por Goodall y Levi, que combinaron el método de cromatografía en papel con la bioautografía de contacto, utilizada originalmente para detectar diferentes penicilinas y estimar su pureza (Goodall y Levi, 1946). Posteriormente, este ensayo fue introducido por Fischer y Lautner, combinando la cromatografía en capa fina (CCF) con métodos de detección biológicos y químicos (Fischer y Lautner, 1961).

La bioautografía es un método de fraccionamiento guiado por bioensayos, que incluye la separación cromatográfica de extractos seguida de la identificación de bioactividad (Wilkinson, 2006). Múltiples estudios han documentado el tamizaje de extractos vegetales orgánicos mediante la técnica de bioautografía (Choma y Grzelak, 2011; Grzelak et al., 2013; Dewanjee et al., 2015; Zang et al., 2020). Para la investigación de compuestos antimicrobianos mediante este enfoque se han descrito tres técnicas bioautográficas: por contacto, directa y por inmersión o superposición de agar (Marston, 2011).

La bioautografía directa es el método más utilizado en los ensayos microbiológicos. En la placa de CCF se permite la separación de los compuestos del extracto o fracción, y posteriormente la CCF se sumerge o se rocía con una suspensión microbiana. Se ha recomendado el caldo Müeller-Hinton suplementado con agar, ya que proporciona un medio suficientemente líquido, que permite una mejor adherencia a la placa de CCF y mantiene

la humedad adecuada para el crecimiento microbiano. El bioautograma se incuba a 25 °C, durante 48 h, en condiciones de humedad.

Para visualizar el crecimiento microbiano, se utilizan con frecuencia sales de tetrazolio, las cuales por acción de las deshidrogenasas de las células bacterianas vivas, son reducidas a su correspondiente formazán que es intensamente coloreado. La sal de violeta de *p*-yodonitrotetrazolio es el reactivo más empleado, estas sales se pulverizan sobre el bioautograma y se vuelve a incubar a 25 °C, durante 24 h, o a 37 °C durante 3 – 4 h, para permitir la formación de su correspondiente formazán. La bioautografía directa se puede emplear para estudios de inhibición de crecimiento en bacterias y hongos (Balouiri et al., 2016).

La bioautografía posee las siguientes ventajas: simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos a partir de extractos crudos. Asimismo, utiliza relativamente muy poca cantidad de muestra, lo cual es ideal cuando se trabaja con extractos de plantas. Además, permite una aproximación a la polaridad de los compuestos activos. Por último, es práctica, fácil de realizar y, una vez que se ha estandarizado, es sumamente reproducible. Sin embargo, no es un método adecuado para detectar actividad biológica producto de la sinergia entre dos o más compuestos. Además, los resultados pueden ser afectados por la descomposición o modificación de los metabolitos, durante la fase de fraccionamiento en la CCF (Wilkinson, 2006).

11.3.3 Dilución en medio de cultivo

El método de dilución fue introducido en el campo de la microbiología a principios de la década de 1870, y permitió el crecimiento e identificación de poblaciones bacterianas en suspensión (Guardino, 2005). Pasteur, Lister, Koch y Ehrlich, quienes trabajaron con el concepto de macrodilución, figuran como los pioneros en el campo de la bacteriología. Asimismo, William Roberts y John Tyndall contribuyeron al desarrollo de este método. Los dos tipos básicos de dilución son la macro y la microdilución, los medios utilizados en ellos son el agar y/o el caldo (Golus et al., 2016; Khan et al., 2019).

La macro o microdilución en caldo es uno de los métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana más básicos. El procedimiento consiste

en preparar una serie de diluciones dobles del agente antimicrobiano (por ejemplo, 128, 64, 32, 16, 8 y 4 $\mu\text{g/mL}$) en un medio de crecimiento líquido. Posteriormente, las diluciones se dispensan en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 mL (macrodilución), o con volúmenes más pequeños en una placa de microtitulación de 96 pocillos (microdilución). Enseguida, cada tubo o pocillo se inocula con un cultivo microbiano estandarizado; los tubos o la microplaca inoculados se incuban (en su mayoría sin agitación) en condiciones adecuadas, según el microorganismo de prueba (Balouiri et al., 2016; Khan et al., 2019).

En el caso de la dilución en agar, los agentes antimicrobianos a evaluar son incorporados en el agar, en una serie de diluciones dobles. Posterior a la solidificación del agar, la superficie es inoculada con una suspensión bacteriana (Balouiri et al., 2016).

Los métodos de dilución son los más adecuados para la determinación de los valores de CMI, ya que permiten estimar la concentración del agente antimicrobiano ensayado en el caldo (macro o microdilución) o en el agar (dilución en agar). Se puede utilizar el método de dilución en caldo o agar, para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos, fracciones o compuestos sobre diversos microorganismos (Klancnik et al., 2010; Golus et al., 2016). El valor de CMI se define como la concentración menor del agente de prueba que inhibe el crecimiento del microorganismo de interés, y generalmente se expresa en $\mu\text{g/mL}$ o mg/L (Molina-Salinas et al., 2007; Machado et al., 2003).

Para la determinación de la CMI, existen dispositivos de visualización que permiten facilitar la lectura de pruebas de microdilución, y el registro de resultados con alta capacidad para discernir el crecimiento en los pozos. Además, se han desarrollado métodos colorimétricos basados en el uso de reactivos colorantes como reveladores. Los colorantes que son empleados frecuentemente en la determinación de la CMI son las sales de tetrazolio, bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) y 2,3-bis {2-metoxi-4-nitro-5 - [(sulfenilamino) carbonil] -2H-tetrazolio-hidróxido} (XTT). Otros, como la resazurina, también son empleados con este propósito (Figura 2) (Martin et al., 2007; Uc-Cachón et al., 2021).

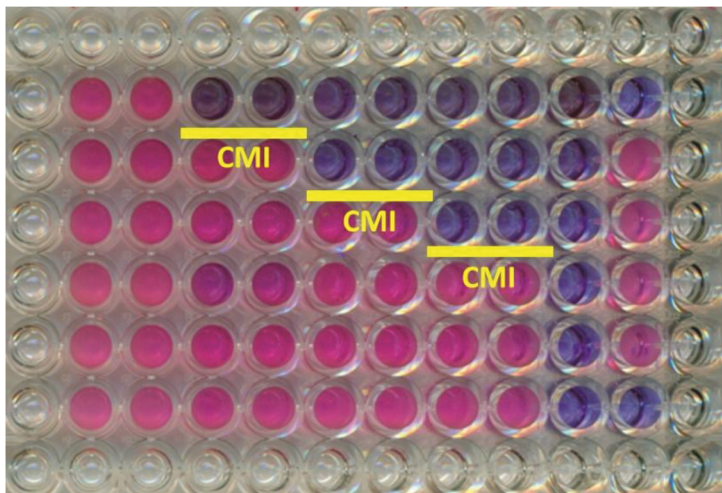


Figura 2. Representación de la microdilución en caldo, usando el colorante de viabilidad resazurina como revelador. La microplaca muestra el REMA de extractos vegetales sobre la bacteria *S. aureus*. Fuente: Los autores.

Al igual que la difusión en agar, actualmente existen normas aprobadas para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos patógenos por métodos de microdilución, los estándares más reconocidos y utilizados son proporcionados por el CLSI, y el EUCAST (Sahu et al., 2018).

La microdilución tiene ventajas, como la reproducibilidad y la menor cantidad de materiales y reactivos, comparadas con la macrodilución y la dilución en agar; y se han diseñado métodos rápidos y confiables como el sistema REMA (REMA, del inglés Resazurin Microtiter Assay), el cual emplea el método de microdilución junto con un indicador de crecimiento como la resazurina, que se ha documentado como un excelente indicador para la detección de agentes antibacterianos (Sarker et al., 2007; Rakhmawatie et al., 2019). La resazurina es un indicador de óxido-reducción, por lo que las células bacterianas metabólicamente activas reducen la resazurina (azul, no fluorescente) a resofurina (rosa, fluorescente), lo que representa una medida cuantificable directa de la actividad antibacteriana (Elshikh et al., 2016) (Figura 3).

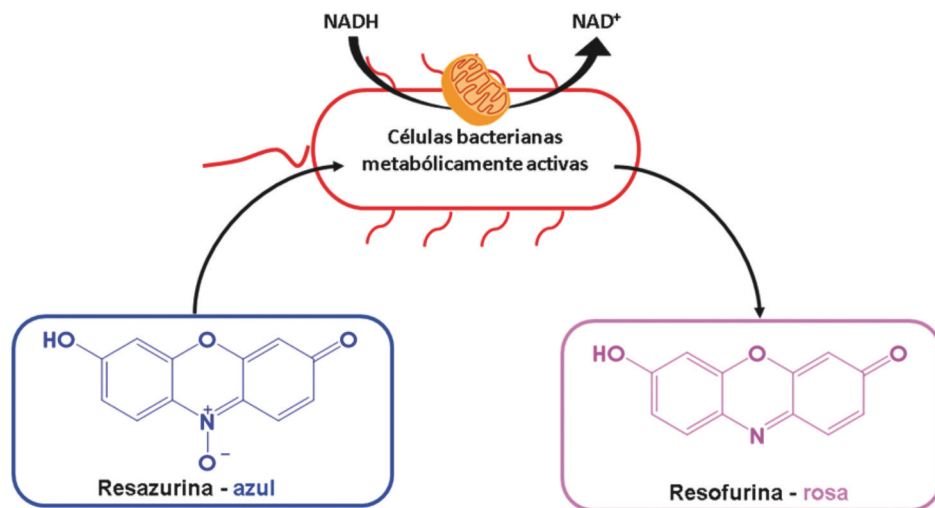


Figura 3. Representación de la reducción del indicador de viabilidad resazurina (forma oxidada, color azul) a resofurina (forma reducida, color rosa), por la acción de las bacterias metabólicamente activas. Abreviaturas: NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida. NAD^+ : dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada. Fuente: Los autores.

11.4 Bioensayo de microdilución en caldo

A continuación se describe detalladamente el método, para su aplicación en bacterias de crecimiento no exigente, por ejemplo: *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Los microorganismos exigentes, como *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, requieren además factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias que no son capaces de sintetizar.

11.4.1 Metodología para determinar la CMI del agente mediante REMA

11.4.1.1 Preparación de los antibióticos como control positivo

Preparar una disolución madre del fármaco antimicrobiano correspondiente, a una concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$ o 10 veces la concentración más alta a evaluar, para luego ser diluida en el caldo. Por ejemplo, para un rango esta-

blecido de 64 a 2 $\mu\text{g/mL}$, preparar una solución de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Los fármacos antimicrobianos se conservan en alícuotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por seis meses. En algunos casos, el límite de solubilidad del antimicrobiano sólo permite preparar soluciones de concentraciones bajas, por lo que es importante seguir las indicaciones del fabricante al preparar disoluciones madre de agentes antimicrobianos, e incluso considerar su potencia. Por último, es importante que los fármacos utilizados como controles positivos sean específicos, según el microorganismo de interés y siguiendo los lineamientos establecidos por CLSI.

11.4.1.2 Reactivación de cepas bacterianas

1. Descongelar las cepas bacterianas criopreservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. Tomar 50 μL de la suspensión bacteriana y transferirla a una caja Petri de $60 \times 100\text{ mm}$ con agar Müller-Hinton AMH.
3. Dispersar la suspensión mediante la técnica de asada, e incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h (cultivo primario), como se muestra en la Figura 4.

11.4.1.3 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo

1. Tomar dos a tres colonias del cultivo primario y transferirlas a un tubo con rosca que contenga 3 mL de caldo Müller-Hinton (CMH) estéril.



Figura 4. Representación del crecimiento bacteriano en placa de agar Müller-Hinton, mediante la técnica de asada. La imagen corresponde a un cultivo bacteriano de *S. aureus*, previo a su uso en los ensayos de evaluación de inhibición de crecimiento *in vitro*. Fuente: Los autores.

2. Disgregar con apoyo de un agitador tipo Vórtex durante 1 min.
3. Tomar 100 μL de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con 3 mL de CMH nuevo (cultivo secundario).
4. Incubar a 37 °C y monitorear el cultivo durante un tiempo de 2 a 4 h, hasta alcanzar un crecimiento que represente una turbidez comparable con el estándar 0.5 de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) determinada con un densitómetro.
5. Realizar una dilución 1:50 del cultivo secundario con CMH. Por cada placa a ensayar, preparar 8 mL de la dilución (Molina-Salinas et al., 2006), la cual se realiza en caja Petri de 60 $\times$ 100 mm. Lo anterior se encuentra esquematizado en la Figura 5.

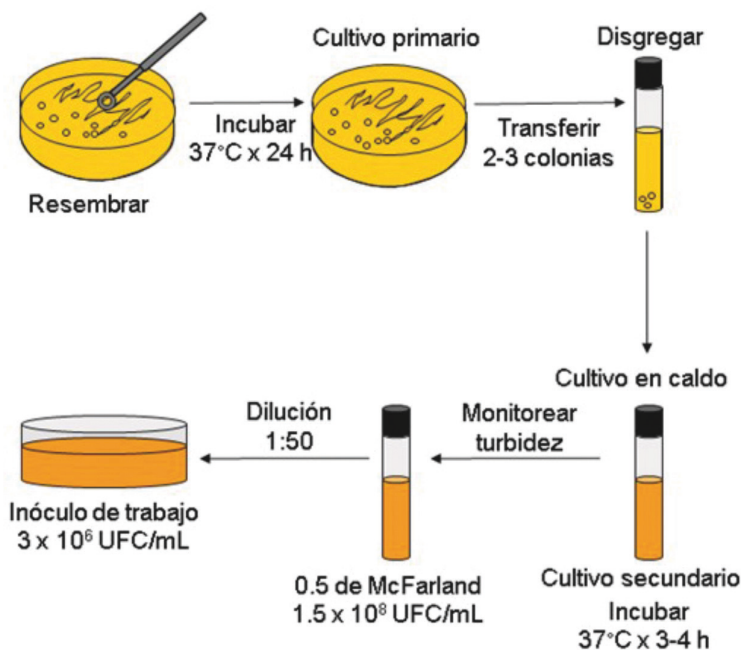


Figura 5. Representación esquemática de la preparación de los inóculos bacterianos de trabajo. Brevemente, colonias de un cultivo primario del microorganismo de prueba son transferidas y disgregadas en un tubo con caldo estéril; posteriormente, una alícuota se transfiere a un tubo con caldo de cultivo y se incuba con monitoreo de la turbidez, hasta que sea equiparable a la del estándar No. 0.5 de McFarland. Por último, se realiza una dilución del cultivo secundario para obtener el inóculo de trabajo. Fuente: Los autores.

11.4.1.4 Preparación de disoluciones stock del agente antimicrobiano a evaluar

Preparar disoluciones stock de extractos, fracciones o compuestos a una concentración de 20 mg/mL. Para la disolución de muestras no solubles o poco solubles en agua, se emplea generalmente DMSO. Para una mejor disolución de la muestra utilizar agitación en vórtex y/o baño de ultrasonido. Las disoluciones stock se autoesterilizarán por permanencia en el DMSO durante 1 h previa a su evaluación (Molina-Salinas *et al.*, 2006). Para cada bacteria en particular, se deberá determinar la concentración tóxica del DMSO o disolvente orgánico utilizado, con la finalidad de realizar las bioevaluaciones en concentraciones subtóxicas.

En caso de que el extracto, fracción o compuesto se disuelva en agua, es necesario esterilizar por filtración, a través de un acrodisco de 0.22 μm con apoyo de jeringa y dentro de campana de bioseguridad.

11.4.1.5 Preparación de disoluciones de trabajo de extractos, fracciones o compuestos a evaluar

Preparar en microtubos estériles la disolución de trabajo de los extractos, fracciones o compuestos a partir de las disoluciones stock. Las disoluciones de trabajo deben estar a una concentración cuatro veces (4 $\times$) la concentración máxima a evaluar en el bioensayo.

11.4.1.6 Preparación de la solución de resazurina

1. Pesar 15 mg de resazurina y disolver en 100 mL de agua destilada.
2. Esterilizar la disolución por filtración, a través de un acrodisco de 0.22 μm y jeringa en campana de bioseguridad.
3. Almacenar en refrigeración a 4 °C y protegida de la luz hasta su uso.

11.4.1.7 Preparación de la microplaca

El REMA se realiza en microplacas de poliestireno de 96 pozos, con tapas de baja evaporación y estériles.

1. Tomar una microplaca de cultivo de 96 pozos nueva, retirarla de su empaque y orientarla de acuerdo con la Figura 6.

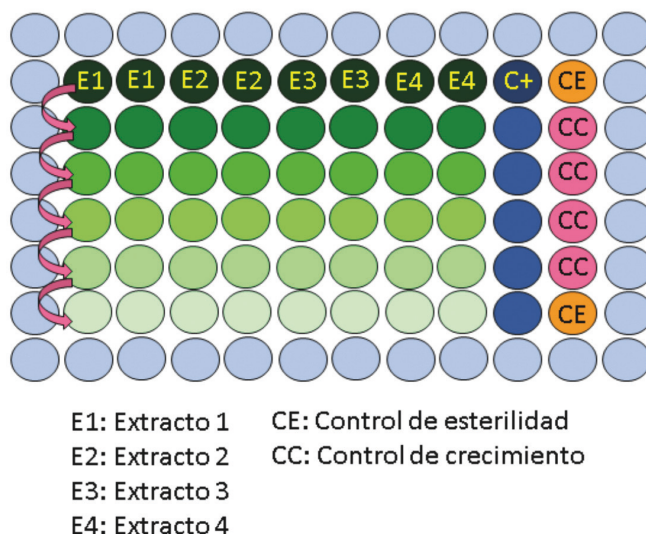


Figura 6. Representación de la microdilución seriada. En una microplaca se pueden evaluar simultáneamente cuatro extractos (fracciones o compuestos puros naturales o sintéticos) por duplicado, incluyendo los controles: positivo, de crecimiento y esterilidad. Fuente: Los autores.

2. Colocar 200 μL de agua destilada estéril en la periferia.
3. Añadir 100 μL de CMH en los 60 pocillos restantes.
4. Adicionar 100 μL de la disolución de trabajo de los extractos, fracciones o compuestos a ensayar, en el pozo en que inicia cada hilera de trabajo. Adicionar otra muestra al pozo adyacente (duplicado).
5. Realizar las diluciones seriadas correspondientes, con la ayuda de la pipeta multicanal (mezclar la dilución del primer pozo y tomar 100 μL de la misma y transferirla al siguiente conjunto de pozos).
6. Tomar 100 μL de la nueva solución y transferirlos al siguiente conjunto de pozos, homogenizar por aspiración y expulsión, evitando la formación de burbujas.
7. Repetir el paso anterior hasta completar la dilución seriada de cada extracto.

8. Agregar el control positivo (fármaco antimicrobiano específico).
9. Adicionar 100 μL de la suspensión bacteriana de trabajo en cada pozo con extracto.
10. Añadir en la placa los controles de crecimiento (medio de cultivo con bacteria) y de esterilidad (medio de cultivo).
11. Colocar la tapa de la placa e introducir en una bolsa de plástico con sellado hermético (tipo ziploc).
12. Transportar cuidadosamente la placa a la incubadora e incubar a 37 °C durante 18 a 24 h. Lo anterior se encuentra esquematizado en la Figura 6.

11.4.1.8 Revelado del bioensayo

1. Transcurrido el tiempo de incubación, transportar la microplaca a la campana de bioseguridad.
2. Añadir 30 μL de la disolución de resazurina a los pozos experimentales y controles.
3. Reincubar las placas durante 2 a 4 h (Grecka et al., 2019).

Nota: Transcurrido el tiempo de incubación con el colorante de viabilidad redox, los controles de crecimiento (bacteria sin fármaco ni agente a evaluar) deberán virar al color rosa, mientras que los controles positivos (con fármaco) y de esterilidad (sin inóculo) permanecerán de color azul.

11.4.1.9 Interpretación de los resultados de CMI

Lectura visual. Realizar la lectura de los pozos, cerciorarse de que el control de crecimiento tenga un color rosa intenso. Se tomará como CMI a la concentración correspondiente al último pozo que permaneció azul (Figura 7).

11.4.2 Metodología para determinar la concentración mínima bactericida del agente antimicrobiano mediante REMA

La concentración mínima bactericida (CMB) se define como la concentración mínima del fármaco letal para la bacteria de interés (Djeussi et al., 2013). Se puede determinar por resiembra del microorganismo, en medio de cultivo

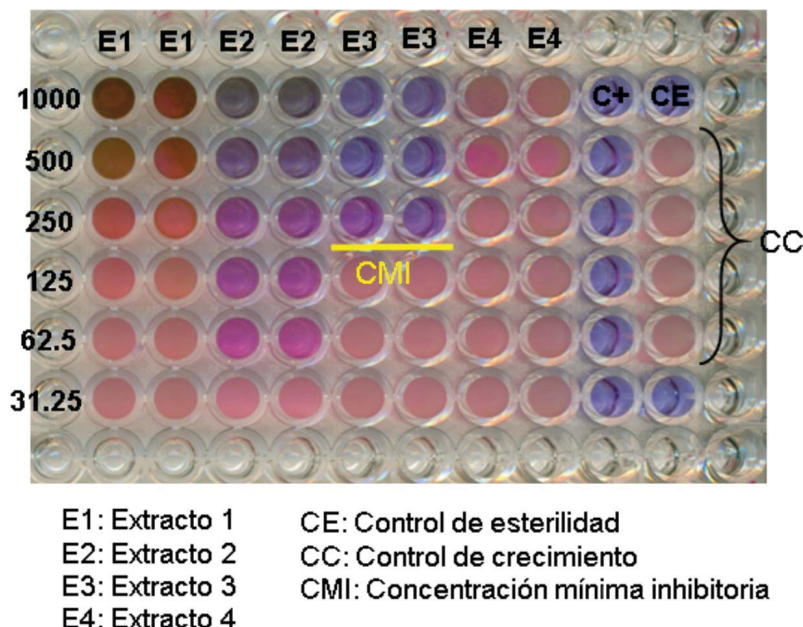


Figura 7. Revelado e interpretación de los resultados. Posterior al tiempo de incubación con el colorante de viabilidad resazurina, se determina el punto de corte como CMI, que corresponde al último pozo que permaneció de color azul. Fuente: Los autores.

libre del fármaco o producto de interés, desde la placa en la que se determinó previamente la CMI (Mogana et al., 2020).

En el micrométodo colorimétrico de REMA, corresponde a la mínima concentración del producto a evaluar, que no permitió el viraje del colorante de viabilidad de azul a cualquier tonalidad de rosa o violeta, es decir, que permaneció de color azul. El procedimiento se detalla a continuación:

11.4.2.1 Resiembra en medio de cultivo líquido

A partir de los cultivos bacterianos tratados con las distintas concentraciones de extractos, fracciones o compuestos, en los cuales se determinó la CMI mediante el método de REMA, se preparará una microplaca de 96 pozos como sigue:

1. Dispensar 200 μ L de agua destilada estéril en los pozos de la periferia.

2. Agregar 195 μL de CMH a los pozos necesarios.
3. Asignar una columna de pozos para incluir: control de crecimiento y negativo.
4. Desde la placa 1: Posterior a la homogenización del contenido de los pozos correspondientes a la $\frac{1}{2}$, 1 y $2\times$ el valor de la CMI de los productos evaluados, tomar 5 μL y transferirlos a los pozos con 195 μL de CMH en la placa 2.
5. Realizar la resiembra por triplicado para cada concentración.
6. Repetir lo anterior con los correspondientes controles positivos (fármaco), de crecimiento y negativo.
7. Incubar y revelar como se explicó anteriormente, lo cual se encuentra representado en la Figura 8.

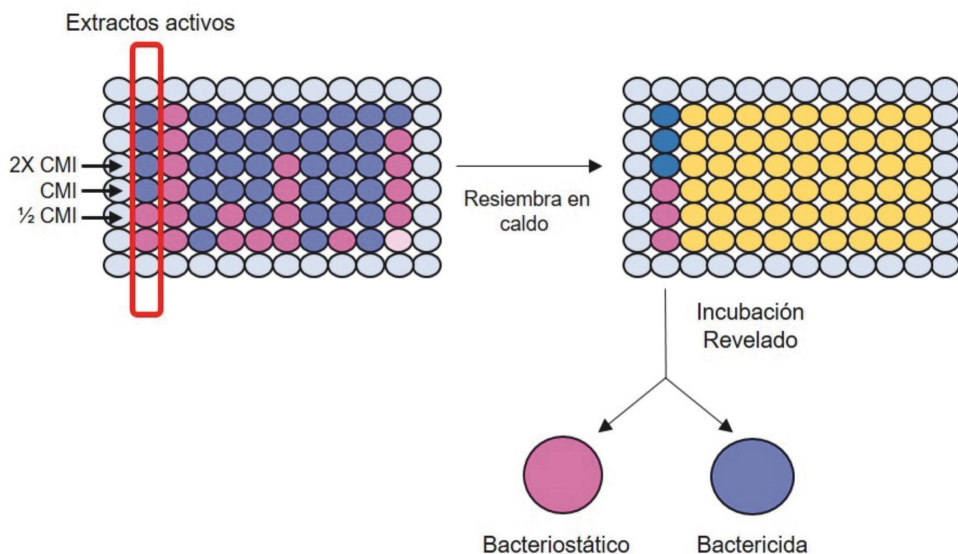


Figura 8. Representación de la caracterización de la actividad antibacteriana en microplaca. Los cultivos bacterianos de los pozos correspondientes a la $\frac{1}{2}$, 1 y $2\times$ CMI, son transferidos a una microplaca con caldo de cultivo estéril, que se incuban y revelan siguiendo el procedimiento descrito, lo que permite la determinación de CMB que corresponde al pozo que permaneció de color azul. Fuente: Los autores.

Conclusiones

Actualmente las infecciones bacterianas se han convertido en un desafío para la salud pública, con una importante morbi-mortalidad, principalmente debida a la RAM ante los antibióticos disponibles. En este escenario, se utilizan ampliamente métodos estandarizados por CLSI y EUCAST, para identificar susceptibilidad de nuevos agentes antimicrobianos. Se distingue el uso del método de microdilución en caldo con colorantes de viabilidad, en particular resazurina (REMA), técnica rápida, económica y reproducible, que permite determinar la CMI y CMB.

Sin embargo, cuando se prueban nuevos compuestos sintéticos o productos de origen natural, frecuentemente se requieren de algunas modificaciones del protocolo estandarizado. Por ejemplo, conocer la toxicidad del disolvente orgánico que contiene el agente de interés sobre el microorganismo; también es imperativa la estandarización del inóculo bacteriano, que permita comparar los resultados de inhibición del crecimiento con lo reportado en la literatura científica.

Referencias

- Abdel-Razek, A., El-Naggar, M., Allam, A., Morsy, O., Othman, S. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, 8(4): 470. doi: 10.3390/pr8040470.
- Ahmad, M. y Khan, A. (2019). Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (19): 313-316. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.024.
- Aljeldah, M. M. (2022). Antimicrobial resistance and its spread is a global threat. *Antibiotics*, 11(8): 1082.
- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., Grajales-Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54 (1): 20-24.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.

- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496. doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493.
- Benkova, M., Soukup, O., Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*, 129: 806-822. doi: 10.1111/jam.14704.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58: 1-26. doi: 10.1038/ja.2005.1.
- Bloom, D. y Cadarette, D. (2019). Infectious disease threats in the twenty-first century: strengthening the global response. *Frontiers in Immunology*, 10: 549. doi: 10.3389/fimmu.2019.00549.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2018). *Healthcare-Associated Infections (HAI)*. (<https://www.cdc.gov/hai/data/index.html>). Consultado el 21 de mayo de 2021.
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada de Ciencias Químico-Biológicas*, 23: 1-11. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202.
- Choma, I. M., Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography, A* 1218: 2684-2691. doi: 10.1016/j.chroma.2010.12.069.
- Christaki, E., Marcou, M., Tofarides, A. (2019). Antimicrobial resistance in bacteria: Mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88: 26-40. doi: 10.1007/s00239-019-09914-3.
- Coria-Lorenzo, J. J., Pérez-Robles, V. M., Pérez-Avendaño, G., Torre-García, M., Mora-Suárez, R., Ojeda-Sánchez, A., Sánchez-Flores, Y., Vázquez-Flores, A., Aguilar-Torrez, R. L. (2017). Patrones de susceptibilidad de Gramnegativos en aislamientos nosocomiales en un hospital de tercer nivel de atención pediátrica: Análisis de su frecuencia y prevalencia en 2 períodos de tiempo (2006 vs. 2012). *Perinatología y Reproducción Humana*, 30: 172-179. doi: 10.1016/j.rprh.2016.10.002.
- Cornejo-Avendaño, J. R. y Ramírez-Rosales, A. (2012) Resistencia antimicrobiana de bacterias cultivadas en la unidad de cuidados intensivos de adultos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 32: 127-133.

De la Cruz-Hernández, I., Cornejo-Juárez, P., Téllez-Miranda, O., Barreira-Pérez, L., Sandoval-Hernández, S., Vilar-Compte, D., Velázquez-Acosta, C., Volkow, P. (2019). Microbiology and prevalence of E2 SKAPE-resistant strains in catheter-related bloodstream infections in patients with cancer. *American Journal of Infection Control* 48: 40-45. doi: 10.1016/j.ajic.2019.06.008.

De Oliveira, D., Forde, B., Kidd, T., Harris, P., Schembri, M., Beatson, S., Patterson, D., Walker, M. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33: 1-49. doi: 10.1128/CMR.00181-19.

Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., Dua, T. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 5: 75-84. doi: 10.1016/j.jpha.2014.06.002.

Djeussi, D., Noumedem, J., Seukep, J., Fankam, A., Voukeng, I., Tankeo, S., Nkuete, A., Kuete, V. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 1-8. doi: 10.1186/1472-6882-13-164.

Duarte-Raya, F. y Granados-Ramírez, M. P. (2012). Resistencia antimicrobiana de bacterias en un hospital de tercer nivel. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 50: 289-300.

ECDPC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2021). (<https://ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net4>). Consultado el 21 de mayo de 2021.

El-Atawy, M. A., Hamed, E. A., Alhadi, M., Omar, A. Z. (2019). Synthesis and antimicrobial activity of some new substituted quinoxalines. *Molecules*, 24: 4198. doi:10.3390/molecules24224198.

Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38: 1015-1019. doi: 10.1007/s10529-016-2079-2.

Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13): 2857-2876.

Fischer, R. y Lautner, H. (1961). On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, 294: 1-7. doi: 10.1002/ardp.19612940102.

Galván-Meléndez, M., Castañeda-Martínez, L., Galindo-Burciaga, M., Morales-Castro, M. (2017). Infecciones asociadas con la atención de la salud y su resistencia antimicrobiana. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 22: 1-13.

García-Palomo, J., Agüero-Balbín, J., Parra-Blanco, J., Santos-Benito, M. (2010). Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Medicine*, 10: 3251-3264. doi: 10.1016/S0304-5412(10)70027-5.

Golus, J., Sawicki, R., Widelski, J., Ginalska, G. (2016). The agar microdilution method. A new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 121: 1291-1299. doi: 10.1111/jam.13253.

Goodall, R. R. y Levi, A. A. (1946). A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Nature*, 158: 675-676. doi: 10.1038/158675a0.

Grecka, K., Kuś, P., Okińczyc, P., Worobo, R., Walkusz, J., Szweda, P. (2019). The anti-staphylococcal potential of ethanolic polish propolis extracts. *Molecules*, 24: 1-24. doi: 10.3390/molecules24091732.

Grzelak, E., Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., Choma, I. (2013). Applications of novel direct bioautography tests for analysis of antimicrobials: a review. *Journal of AOAC International*, 96: 1167-1174. doi: 10.5740/jaoacint.SGEGrzalak.

Guardino, R. (2005). Early history of microbiology and microbiological methods. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, 1: 1-27.

Guglielmi, P., Pontecorvi, V., Rotondi, G. (2020). Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30: 949-962. doi: 10.1080/13543776.2020.1853101.

Gutiérrez-Muñoz, J., Ramírez-Corona, A., Martínez-Bustamante, M., Coria-Lorenzo, J., Armenta-Gallegos, L., Ayala-Franco, J. (2017). Estudio multicéntrico

de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30: 68-75.

Heatley, N. (1944) A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*, 38: 61-65. doi: 10.1042/bj0380061.

Holmes, K., Bertozzi, S., Bloom, B., Jha, P., Gelband, H., Demaria, L., Horton, S. (2017). Major infectious diseases: key messages from disease control priorities. En: Holmes, K. K., Bertozzi, S., Bloom, B. R., Jha, P. (eds.). *Major Infectious Diseases*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, Washington (pp. 1-27). doi: 10.1596/978-1-4648-0524-0_ch1.

Humphries, R. M., Ambler, J., Mitchell, S. L., Castanheira, M., Dingle, T., Hindler, J. A., Koeth, L., Sei, K. (2018). CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 56: 1-10. doi: 10.1128/JCM.01934-17.

Huremović, D. (2019). Brief history of pandemics (Pandemics Throughout History). En: Huremović, D. (ed.). *Psychiatry of Pandemics*. Springer, Nueva York (pp: 7-35). doi: 10.1007/978-3-030-15346-5_2.

Kawsar, S. M., Hosen, M. A., El Bakri, Y., Ahmad, S., Affi, S. T., Goumri-Said, S. (2022). In silico approach for potential antimicrobial agents through antiviral, molecular docking, molecular dynamics, pharmacokinetic and bioactivity predictions of galactopyranoside derivatives. *Arab. Journal of Basic and Applied Sciences*, 29(1), 99-112.

Khan, Z., Siddiqui, M., Park, S. (2019). Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*, 9: 1-17. doi: 10.3390/diagnostics9020049.

Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., Mozina, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121-126. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.004.

Lindahl Johanna, D. V. M. y Grace, D. (2015). The consequences of human actions on risks for infectious diseases: A review. *Infection Ecology & Epidemiology*, 5: 1-11. doi: 10.3402/iee.v5.30048.

Liu, Y., Li, R., Xiao, X., Wang, Z. (2018). Molecules that inhibit bacterial resistance enzymes. *Molecules*, 24(1): 43.

- Machado, T. B., Pinto, A. V., Pinto, M. C. F. R., Leal, I. C. R., Silva, M. G., Amaral, A. C. F., Kuster, R. M., Netto-DosSantos, K. R. (2003). *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21: 279-284.
- Mann, C. M. y Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 538-544. doi:10.1016/S0924-8579(02)00349-7.
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A* 1218: 2676-2683. doi: 10.1016/j.chroma.2010.12.068.
- Martin, A., Portaels, F., Palomino, J. C. (2007). Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 175-183. doi: 10.1093/jac/dkl477.
- Matuschek, E., Brown, D. F. J., Kahlmeter, G. (2014). Development of the EU-CAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20: O255-O266. doi: 10.1111/1469-0691.12373.
- Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M. N., Ramliza, R., Wiart, C. (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions, and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC Complementary Medicine Therapies*, 20: 1-11. doi: 10.1186/s12906-020-2837-5.
- Molina-Salinas, G., Ramos-Guerra, M., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B., Becerril-Montes, P., Said-Fernández, S. (2006). Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*, 37: 45-49. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.04.010.
- Molina-Salinas, G., Pérez-López, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernández, S., De Torres, N. (2007). Evaluation of the flora of northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 435-441.

- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C., Vojnov, A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40: 223-231. doi: 10.1080/10715760500473834.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R. et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325): 629-655.
- Newman, D. y Cragg, G. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79: 629-661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- Newman, D. y Cragg, G. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83: 770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- Oldenkamp, R., Schultsz, C., Mancini, E., Cappuccio, A. (2021). Filling the gaps in the global prevalence map of clinical antimicrobial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118: 1-7. doi: 10.1073/pnas.2013515118.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance*. Disponible en: (https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf).
- Ponce de León, S. (2018). Resistencia antimicrobiana y consumo de antibióticos. Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México. Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA, Ciudad de México. Disponible en: (http://www.puis.unam.mx/slider_docs/reportes-ucradigital.pdf).
- Rakhmawatie, M. D., Wibawa, T., Lisdiyanti, P., Pratiwi Woro, M. (2019). Evaluation of crystal violet decolorization assay and resazurin microplate assay for antimycobacterial screening. *Heliyon*, 5: 1-7. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02263.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3): 482.
- Ríos, J. L., Recio, M. C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2-3): 127-149.

- Sahu, C., Jain, V., Mishra, P., Prasad, N. (2018). Clinical and laboratory standards institute versus European committee for antimicrobial susceptibility testing guidelines for interpretation of carbapenem antimicrobial susceptibility results for *Escherichia coli* in urinary tract infection (UTI). *Journal of Laboratory Physicians*, 10: 289-293. doi: 10.4103/JLP.JLP_176_17.
- Santajit, S., Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2016/2475067.
- Sarker, S., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42: 321-324. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.006.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M., Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4: 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2013.00047.
- Sharma, A., Flores-Vallejo, R. C., Cardoso-Taketa, A., Villarreal, M. L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 208: 264-329. doi: 10.1016/j.jep.2016.04.045.
- Straif-Bourgeois, S., Ratard, R., Kretzschmar, M. (2014). Infectious disease epidemiology. *Handbook of Epidemiology*, 2014: 2041-2119. doi: 10.1007/978-0-387-09834-0_34.
- Svanberg-Frisinger, F., Jana, B., Donadio, S., Guardabassi, L. (2021). *In silico* prediction and prioritization of novel selective antimicrobial drug targets in *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 10(6): 632.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N. y WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 18: 318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- Torres-Erazo, D., Domínguez-Méndez, J., Buenfil-Vera, L., Cícero-Ancona, M. (2018). Características clínicas y microbiológicas de pacientes con infec-

ciones asociadas a los cuidados de la salud en un hospital de alta especialidad de Yucatán. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 38: 44-49.

Trovato, M., Sartorius, R., D'Apice, L., Manco, R., De Berardinis, P. (2020). Viral emerging diseases: challenges in developing vaccination strategies. *Frontiers in Immunology*, 11: 2130. doi: 10.3389/fimmu.2020.02130.

Uc-Cachón, A. H., Gracida-Osorno, C., Luna-Chi, I., Jiménez-Guillermo, J., Molina-Salinas, G. M. (2019). High prevalence of antimicrobial resistance among Gram-negative isolated bacilli in intensive care units at a tertiary-care hospital in Yucatán Mexico. *Medicina*, 55: 1-13. doi: 10.3390/medicina55090588.

Uc-Cachón, A. H., Dzul-Beh, A. J., Palma-Pech, G. A., Jiménez-Delgadillo, B., Flores-Guido, J. S., Gracida-Osorno, C., Molina-Salinas, G. M. (2021). Antibacterial and antibiofilm activities of Mayan medicinal plants against Methicillin-susceptible and -resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 279: 114369. doi:10.1016/j.jep.2021.114369.

Vanegas-Múnera, J. M. y Jiménez-Quiceno, J. N. (2020). Resistencia antimicrobiana en el siglo XXI: ¿Hacia una era postantibiótica? *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 38(1): e337759. (<https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v38n1e337759V>).

Vollaro, A., Catania, M. R., Iesce, M. R., Sferruzza, R., D'Abrosca, B., Donnarumma, G., De Filippis, A., Cermola, F., DellaGreca, M., Buommino, E. (2019). Antimicrobial and anti-biofilm properties of novel synthetic lignan-like compounds. *The New Microbiologica*, 42: 21-28.

Weinstein, M. P., Patel, J. B., Bobenchik, A. M., Campeau, S., Cullen, S. K., Gallas, M. F., Gold, H., Humphries, R. M., Kirn, T. J., Lewis, J. S. et al. (2019). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard*. Volumen 32. Vigésima novena edición. Clinical and Laboratory Standards Institute, Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.

WHO (World Health Organization) (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. (https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM-WHO.pdf?ua=1). Consultado el 21 de mayo de 2021.

WHO (2019). *More than 1 million new curable sexually transmitted infections every day*. (<https://www.who.int/news/item/06-06-2019-more-than-1-million-new>

curable-sexually-transmitted-infections-every-day). Consultado el 21 de mayo de 2021.

WHO (2020). *Global Tuberculosis Report*. (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>). Consultado el 21 de mayo de 2021.

WHO (2021a). *Cholera*. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cholera>). Consultado el 21 de mayo de 2021.

WHO (2021b). *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)*. (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332081/9789240005587-eng.pdf?ua=1>). Consultado el 21 de mayo de 2021.

Wilkinson, J. (2006). Methods for testing antimicrobial activity of extracts. En: Owais, M. O. M. (ed.). *Modern Phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs*. John Wiley & Sons, Nueva Jersey. (pp. 157-198).

Zang, Y., Cheng, Z., Wu, T. (2020). TLC bioautography on screening of bioactive natural products: An update review. *Current Analytical Chemistry*, 16: 545. doi: 10.2174/1573411015666181224145346.

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Xingwang, L., Bo, Y., Jingdong, S., Xiang, Z., Baoying, H., Weifeng, S., Roujian, L., Peihua, N., Faxian, Z., Xuejun, M., Dayan, W., Wenbo, X., Guizhen, W. (2020). A novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382: 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.

Capítulo 12.

Métodos experimentales de evaluación de nuevos agentes contra la leishmaniasis y tripanosomiasis

Manuel Jesús Chan Bacab*

* Centro de Investigación en Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche.

12.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades tropicales y subtropicales olvidadas con diferentes manifestaciones clínicas causadas por especies de parásitos de *Leishmania*, que se transmiten por la picadura de las hembras de flebotomos infectadas del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Tchokouaha et al., 2018). A la fecha se conocen veinte especies de *Leishmania* que infectan y causan una de las tres formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Las formas cutáneas son producidas por complejos de *L. mexicana* o *L. braziliensis* en las Américas y *L. major*, *L. tropica* o *L. aethiopica* en el Viejo Mundo. Las lesiones cutáneas se resuelven espontáneamente al cabo de algunos meses, pero, dependiendo de la especie de *Leishmania* que las provoque, pueden evolucionar a leishmaniasis mucocutánea. La leishmaniasis visceral es causada por *L. chagasi* en América Latina, *L. donovani* en África y Asia, o *L. infantum* en la cuenca mediterránea, y puede ser fatal si no se trata (Requena et al., 2004).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis es una de las siete enfermedades tropicales más importantes y representa un grave problema de salud mundial. Se estima que hay entre 700,000 y 1'000,000 de nuevos casos de leishmaniasis anualmente en el mundo, ampliamente distribuidos en zonas de clima tropical y subtropical, que provocan de 26,000 a 65,000 muertes (Battista et al., 2020). En todos los continentes, excepto Oceanía, hay regiones endémicas en áreas geográficas circunscritas en el noreste de África, el sur de Europa, el Medio Oriente, el sureste de México y América Central y del Sur (Torres-Guerrero et al., 2017).

12.1.1 Epidemiología

En México se ha reportado una incidencia anual de 11.5 por cada 100,000 habitantes y su presencia en 22 estados, siendo la principal zona endémica, la región neotropical del sureste, sur de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y parte de Yucatán. Comúnmente afecta a recolectores de gomas vegetales, productores de cacao y banano, madereros, cazadores, biólogos, ornitólogos, practicantes de turismo ecológico y personal militar. Los dos principales vectores de esta enfermedad en la península de Yucatán son *Lutzomyia olmeca* y *Lutzomyia cruciata*. En Campeche

y Yucatán, *Leishmania mexicana* es el principal agente causal y las presentaciones más comunes son la forma cutánea y cutáneo-condral, que al afectar la oreja causan la clásica úlcera del chiclero o úlcera del recolector de gomas vegetales (Torres-Guerrero et al., 2017; Gutiérrez-Rebolledo et al., 2017).

12.1.2 Mecanismos fisiopatológicos

Durante su ciclo biológico, los parásitos del género *Leishmania* existen en dos formas que se desarrollan en un huésped diferente: una forma extracelular flagelada conocida como promastigote y una intracelular designada como amastigote. La forma que infecta, tanto al hombre como a otros huéspedes vertebrados, es el promastigote, que mide de 15 a 20 μm de longitud, tiene un flagelo en su parte frontal y vive en el tracto digestivo del insecto transmisor de la enfermedad. El amastigote, la forma parasitaria, tiene un diámetro de aproximadamente 2.3 μm , un flagelo rudimentario y se encuentra dentro de los macrófagos del huésped.

Como consecuencia de la picadura de un mosquito hembra infectado, los promastigotes son fagocitados rápidamente por los macrófagos del endotelio reticular, dentro de los cuales los organismos se transforman en amastigotes. Los lisosomas se fusionan con los fagosomas que contienen a los parásitos, pero los amastigotes resisten las enzimas fagolisosomales. La multiplicación de los amastigotes dentro de los fagolisosomas de los macrófagos de la piel, mucosas y vísceras da lugar a la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral, respectivamente. Después de la multiplicación, los amastigotes lisan las células hospederas, reinfectan otros macrófagos y luego regresan al vector invertebrado cuando éste se alimenta con sangre del huésped infectado (Balaña-Fouce et al., 1998; Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001).

Las principales lesiones de la leishmaniasis cutánea son pápulas eritematosas en las áreas expuestas del cuerpo, donde se han alimentado los flebótomos infectados. El período de incubación puede ser tan corto como de una a dos semanas, o tan largo como de uno a dos meses. La lesión inicial puede ser pruriginosa, pero no dolorosa. La úlcera puede permanecer relativamente seca con una costra central (forma seca) o puede exudar material seropurulento (forma húmeda). Pueden estar presentes múltiples lesiones, dependiendo de la naturaleza de la exposición a los flebótomos infectados.

Con frecuencia, la leishmaniasis cutánea produce lesiones autocurativas, pero pueden persistir hasta un año o más sin tratamiento.

La leishmaniasis cutánea difusa es una complicación rara de la enfermedad cutánea, asociada con la falta de respuesta inmunológica a los antígenos de *Leishmania*. Comienza como una lesión cutánea, ulcerativa regular, pero luego progresa hasta afectar múltiples sitios como nódulos o placas no ulcerosas, especialmente alrededor de la cara y en la superficie externa de los brazos y las piernas (Balaña-Fouce et al., 1998; Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001).

La leishmaniasis mucocutánea americana (espundia) es una enfermedad que comienza con una forma cutánea o cicatriz típica en el lugar donde ha picado el flebotomo, por lo que se debe a la metástasis de los parásitos a sitios mucosos, a partir de una lesión cutánea primaria. La leishmaniasis mucocutánea suele provocar una desfiguración facial, debido a la erosión de los sitios mucocutáneos de la boca y la nariz. La destrucción puede extenderse a la piel vecina, orofaringe, faringe e incluso la tráquea (Balaña-Fouce et al., 1998; Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001).

La leishmaniasis visceral es la forma más severa, no autocurativa y con frecuencia fatal sin tratamiento. Los síntomas comienzan después de un período de incubación inusualmente largo de entre uno a tres meses. La aparición de la enfermedad es insidiosa, pero se hace gradualmente perceptible con la aparición de fiebre irregular, acompañada de sudor, debilidad y pérdida de peso. En casos avanzados, puede desarrollarse esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía y anemia. Pueden desarrollarse edemas y ascitis y, en los casos no tratados, es común que se produzcan muertes debido a infecciones bacterianas secundarias como la neumonía, la tuberculosis o la disentería. La leishmaniasis visceral puede ser una infección oportunista, en el sentido de que todos los factores de riesgo que se han identificado, como la edad, la mala nutrición y la infección concurrente, están asociados con una respuesta inmunológica subóptima o comprometida (Balaña-Fouce et al., 1998).

12.1.3 Modelo de bioensayo

La mayoría de los estudios dirigidos a la detección de compuestos con actividad leishmanicida se han realizado usando la forma de promastigotes

del parásito, porque es más fácil de mantener en condiciones *in vitro*, en medio líquido suplementado con suero fetal bovino, y el ensayo permite la evaluación de cientos de compuestos utilizando equipos poco sofisticados. Sin embargo, ya que el promastigote no es la forma infecciosa del parásito en los huéspedes vertebrados, las evaluaciones hechas con promastigotes sólo tienen un valor indicativo de la posible actividad leishmanicida del metabolito probado.

Los ensayos se realizan en placas de 96 pozos y todas las muestras a evaluar se solubilizan en dimetilsulfóxido (DMSO), las cuales se diluyen en medio de cultivo líquido. En cada pozo, 100 µl de solución de la muestra a evaluar se mezcla con 100 µl del medio de cultivo que contiene 100,000 parásitos, por lo que la concentración de la muestra es igual o menor a 100 mg/µl, y la concentración de DMSO no debe superar el 0.5 %. Se pueden incluir controles con parásitos en una solución de DMSO al 0.5 % y controles positivos, tales como pentamidina, anfotericina B o miltefosina. La placa se incuba a 25 °C durante 72 h y la actividad leishmanicida de los extractos se determina mediante la observación directa, a través de un microscopio de fase invertida, observando la presencia y la motilidad de la promastigotes en cada pozo, así como su conteo en un hematocitómetro (Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001; Tempone et al., 2011; Chan-Bacab et al., 2003).

El uso de promastigotes debe complementarse con una evaluación de amastigotes intracelulares en macrófagos. Al mismo tiempo, debe realizarse una evaluación de la posible citotoxicidad del metabolito utilizando macrófagos no parasitados, esto con el fin de establecer si la actividad *in vitro* del metabolito es debida a su actividad citotóxica general o si posee una actividad selectiva contra el parásito (Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001).

12.1.4 Técnicas especializadas de bioensayos

En general, la mayoría de los ensayos requieren mucho tiempo y las metodologías más rápidas requieren instrumentos sofisticados; sin embargo, su costo es prohibitivo para la mayoría de los laboratorios de los países en desarrollo. Además, la determinación de la actividad del fármaco con amastigotes intracelulares es indispensable, y requiere una intensa manipulación experimental durante muchos días. Finalmente, la evaluación de nuevos

candidatos a fármacos requiere ensayos *in vivo*, y también requiere investigaciones de mucho tiempo, que van desde algunos días hasta varios meses (Tempone et al., 2011).

La evaluación *in vitro* con promastigotes puede complementarse con una prueba colorimétrica, utilizando una sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), haciendo el ensayo de viabilidad más preciso, ya que se analiza en un espectrofotómetro para placas de 96 pozos. Este método se basa en la actividad oxidativa de las mitocondrias, y proporciona información adicional sobre si un compuesto tiene actividad leishmanicida. La presencia de un color púrpura del formazán es indicativa de parásitos viables. Una gran ventaja de este ensayo es la facilidad de obtener las curvas de la concentración efectiva media (CE_{50}), que se pueden determinar después de una incubación de 24 h con el parásito, seguida de una incubación de 4 horas con el sustrato MTT.

Además, la observación bajo un microscopio puede realizarse antes de la adición del sustrato de MTT, para evaluar la motilidad y la morfología del parásito. Una de las principales desventajas del ensayo es la posible oxidación del sustrato de MTT por los compuestos de prueba, resultando en falsos negativos. Se puede incluir un paso de centrifugación rápida de la placa para extraer el compuesto de prueba de los medios, antes de la adición del MTT (Tempone et al., 2011).

Una alternativa al ensayo colorimétrico con MTT es el indicador de oxidación-reducción, azul de Alamar. Este ensayo se basa en la conversión de la resazurina, un colorante azul no fluorescente, que es metabolizada por enzimas mitocondriales de los parásitos a resorufina, un derivado rosa fluorescente. Tras la incubación del azul de Alamar con las muestras (extractos crudos, fracciones enriquecidas o compuestos puros), se determina la viabilidad de los parásitos a 570 nm en un lector de microplacas (Tempone et al., 2011; O'Brien et al., 2000).

Por otra parte, el uso de amastigotes axénicos para la selección de compuestos presenta algunas ventajas. Esta prueba se realiza con una etapa clínicamente relevante del parásito. Además, la cuantificación de la actividad del fármaco es muy factible. Esto se logra con un contador de células, evaluando la viabilidad celular utilizando MTT, determinando la actividad de la

ornitina descarboxilasa o con un colorante fluorescente, como el yoduro de propidio. Sin embargo, ciertos análisis bioquímicos y los marcadores inmunológicos de los amastigotes axénicos deben ser confirmados, y se requiere una alta concentración de suero en algunos sistemas.

Se han observado diferencias en la sensibilidad a los fármacos entre los amastigotes axénicos y los amastigotes intracelulares, ya que la prueba con amastigotes axénicos da lugar a un acceso libre del fármaco contra los parásitos y, en consecuencia, se determina un elevado número de compuestos activos. Dado que los parásitos de *Leishmania* son patógenos intracelulares, se recomienda el uso de un ensayo intracelular para confirmar los efectos (Tempone et al., 2011).

El uso de un ensayo con amastigotes intracelulares proporciona información más pertinente sobre la eficacia del compuesto. Se trata también de un ensayo que requiere mucho tiempo, ya que la evaluación inicial de la citotoxicidad de las muestras de ensayo es obligatoria, para evitar el uso de altas concentraciones de muestras, que podría dañar a los macrófagos. Muchas células de mamíferos se han utilizado para albergar los amastigotes de *Leishmania*, incluidos macrófagos peritoneales de ratón, macrófagos derivados de la médula ósea, macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica y macrófagos derivados de monocitos tumorales (THP-1), lo que da lugar a variaciones muy significativas en la susceptibilidad a los fármacos. Los datos en la literatura han indicado que los macrófagos peritoneales de ratón son el modelo más preciso, proporcionando resultados reproducibles después de 96-120 h y una elevada proporción de infección (> 90 %), que es esencial para un análisis preciso (Tempone et al., 2011).

Los amastigotes son las formas más apropiadas para la infección de macrófagos *in vitro*. Alternativamente, los amastigotes pueden obtenerse por transformación *in vitro* de promastigotes con cambios mínimos en las condiciones de crecimiento y temperatura. Este método proporciona ensayos eficaces de susceptibilidad a los fármacos con infección persistente en los macrófagos. Después de 96 a 120 h, los portaobjetos se fijan con metanol y son teñidos con Giemsa para la observación microscópica (100X e inmersión en aceite). La eficacia del fármaco es determinada tomando en cuenta la reducción media del índice parasitario (IP = número medio de células

infectadas × número medio de amastigotes por macrófago) de 500 macrófagos (Tempone et al., 2011).

12.2 Tripanosomiasis

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, y se caracteriza por ser una infección generalizada que cursa clínicamente a partir de una forma aguda hasta llegar a la cronicidad. La infección por *T. cruzi* es curable si el tratamiento se inicia poco después de la infección; si la enfermedad se vuelve crónica, el paciente puede desarrollar alteraciones cardíacas, digestivas y/o neurológicas. La enfermedad es transmitida a los seres humanos por vectores, principalmente insectos hematófagos de la familia Triatominae; y en otros casos, la transmisión puede ser posible a través de transfusiones de sangre, infección congénita, lactancia materna o accidentes de laboratorio (Liñares et al., 2006).

Esta enfermedad representa un problema de salud pública importante en 21 países de América Latina, donde la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que aproximadamente afecta entre seis y siete millones de personas, y 70 millones están en riesgo de contraer la infección, así como también es responsable de 30 mil nuevos casos y 14 mil muertes al año (PAHO, 2020).

12.2.1 Epidemiología

En México, las regiones endémicas se dan principalmente en la parte sur y costera del país, ubicadas a menos de 1800 metros sobre el nivel del mar, donde dos terceras partes del territorio pueden ser consideradas en riesgo de transmisión vectorial, es decir, que 1'100,000 individuos podrían estar infectados con *T. cruzi* y 29'500,000 en riesgo de contraer la infección. En la península de Yucatán se han reportado tasas de seroprevalencia de 11-18% en la población general, y un 5.6 % en donantes de sangre. Adicionalmente, se ha estimado que en la península de Yucatán alrededor de 1.6-1.7 millones de personas están expuestas a un riesgo mediano-alto de transmisión de *T. cruzi*, con más del 90 % de éstas localizadas en el estado de Yucatán. En 2018, las entidades con mayor tasa de incidencia fueron Yucatán, Quintana Roo y Nayarit (Rojo-Medina et al., 2018).

La transmisión vectorial se lleva a cabo por 32 especies de triatominos y se consideran domiciliadas, peridomiciliadas y selváticas o silvestres. En nuestro país, las especies intradomiciliadas son *Triatoma barberi*, asociada a la presencia de miocardiopatías y megas (dilataciones) de órganos del tracto digestivo, en Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz, mientras que *Triatoma dimidiata*, distribuida desde los países andinos y de Centroamérica hasta México, es asociada a cardiopatías en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Salazar-Schettino et al., 2016).

12.2.2 Mecanismos fisiopatológicos

En el ciclo biológico natural están involucrados, además del hombre y el artrópodo transmisor, gran número de especies de mamíferos infectados. Cuando el vector se alimenta de un mamífero infectado ingiere, junto con la sangre, al parásito circulante. En la luz del intestino se multiplica y se desarrollan como tripomastigotes metacíclicos, que son las formas infectantes. La infección en el humano es adquirida, principalmente, por la penetración transcutánea del parásito presente en las excretas de estos insectos hematófagos infectados. Los tripomastigotes metacíclicos atraviesan piel o mucosas y circulan como tripomastigotes sanguíneos. Posteriormente, se transforman en amastigotes, de manera intracelular, los cuales se multiplican por fisión binaria longitudinal dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear, tejido linfóide, muscular o nervioso, y el ciclo se completa cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector (Salazar-Schettino et al., 2016).

La fase aguda se da en 5 % de los infectados, con duración de dos a tres semanas y ocasionalmente hasta cuatro meses; los síntomas inician alrededor de 10 días después de la infección, y en los casos de transmisión por transfusión sanguínea aparecen entre 20 y 40 días después. Los niños menores de 10 años son los más afectados, aproximadamente el 75 % presenta signos y síntomas relacionados con la vía de entrada del parásito, con manifestaciones sistémicas inespecíficas, principalmente fiebre. En 50 % de los casos, cuando la vía de entrada es cercana a la mucosa ocular,

se presenta el complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña-Mazza, que consiste en edema bupalpebral unilateral de color violáceo, ligeramente pruriginoso, acompañado de adenopatías regionales. Cuando la vía de entrada es en otra región, se denomina chagoma de inoculación (25 %), que es una lesión nodular subcutánea también de color violáceo. En la fase aguda, el daño a los tejidos en corazón y del tracto intestinal se relaciona directamente con la parasitemia y el parasitismo en los tejidos (Rojo-Medina *et al.*, 2018; Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

La fase crónica asintomática o indeterminada dura entre cinco, 10 y hasta 20 años; es clínicamente silenciosa con parasitemia muy baja, por lo que los métodos serológicos son de elección para el diagnóstico. Después de esta fase se presenta la fase crónica sintomática, en la que 27 % desarrollan lesiones cardíacas, 6 % digestivas —principalmente en esófago y colon— y 3 % en el sistema nervioso periférico. En la fase crónica sintomática, el órgano más afectado es el corazón, con alteraciones en la contractilidad y conductibilidad, con insuficiencia cardíaca progresiva y cardiomegalia.

Durante la cardiopatía crónica, se presenta un proceso inflamatorio crónico, donde la principal citocina implicada es TGF- β . La lesión característica es la miocarditis difusa con infiltrados linfocíticos, presencia de inmunoglobulinas con escasos elementos parasitarios y pequeños focos inflamatorios, que generan hipertrofia miocelular con miocitólisis, e intensa fibrosis reparativa con acumulación intersticial de fibras de colágeno que conducen a remodelación ventricular y deterioro de la función, inicialmente durante la diástole y después en la sístole. Esta fibrosis genera trastornos en la motilidad parietal y cavitaria, con el consecuente deterioro de la función cardíaca (Rojo-Medina *et al.*, 2018; Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

12.2.3 Modelo de bioensayo

Diversos bioensayos han sido desarrollados para evaluar la actividad de nuevos compuestos, utilizando las formas epimastigote, tripomastigote y amastigote de *T. cruzi*. Estas tres formas del parásito son morfológica y bioquímicamente diferentes (Docampo, 2001).

Los epimastigotes son las formas de multiplicación extracelular de los parásitos de *T. cruzi* en el vector. La facilidad en que esta forma puede ser

cultivada y su relativa sensibilidad a la acción de los fármacos estándares, han permitido que este modelo de bioensayo *in vitro* sea utilizado, de manera preliminar, para realizar evaluaciones selectivas. Sin embargo, una vez que esta primera prueba se ha realizado, se requieren métodos más específicos para determinar la actividad antiprotozoaria de estos compuestos (Muelas-Serrano et al., 2002).

Por lo general para realizar un bioensayo con epimastigotes, éstos se cultivan en medio líquido suplementado con suero fetal bovino a 26 °C o 28 °C. Los cultivos se inician con una densidad celular determinada de epimastigotes por ml, y el fármaco, con diferentes concentraciones, es añadido (Docampo, 2001; Muelas-Serrano et al., 2002). Esta prueba se incuba por 48 o 72 h, y al término de este tiempo se registra la actividad del fármaco sobre el parásito, tomando en cuenta la densidad celular o la viabilidad del mismo. La densidad celular puede ser medida con un conteo directo, por medio de un hemacitómetro (Muelas-Serrano et al., 2002). También la actividad del fármaco se puede establecer, observando la concentración a la cual los parásitos están completamente inmóviles o lisados, obteniéndose la concentración mínima inhibitoria del 100 % (CMI₁₀₀) (Abe et al., 2002).

12.2.4 Técnicas especializadas de bioensayos

La viabilidad en el bioensayo *in vitro* con epimastigotes también se puede cuantificar con el método de exclusión del colorante azul de tripano, utilizando microscopía óptica o el ensayo de reducción del MTT, el cual puede ser cuantificado en un lector de ELISA a 595 nm (Muelas-Serrano et al., 2000).

Para la evaluación *in vitro* con tripomastigotes, éstos son cultivados en sangre infectada colectada de animales con una parasitemia adecuada. La sangre infectada es diluida a una concentración determinada de tripomastigotes por ml, al igual que el fármaco. Las placas se incuban a 4 °C o 37 °C, y después de 24 o 48 h, los parásitos son contados en una cámara de Neubauer, estableciéndose como resultado la dosis letal media (DL₅₀), que resulta de la lisis de la mitad de la población de tripomastigotes (Vieira et al., 2001).

En la evaluación *in vitro* con amastigotes, éstos se cultivan en macrófagos, células L-6 (mioblastos del músculo esquelético de ratón) u otras

células (Burleigh y Andrews, 1995). Las células se infectan con tripomastigotes y después se añade una determinada concentración del fármaco disuelto en medio de cultivo, incubándose por 96 horas (Buckner et al., 1996). La inhibición del crecimiento intracelular se determina contando el número de amastigotes en 100 células infectadas, para lo cual se utiliza la tinción de las células con el método May Grünwal-Giemsa con microscopía óptica (Zuccotto et al., 2001).

Referencias

- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(9): 1188-1191. doi: 10.1248/bpb.25.1188.
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubría, J. C., Ordóñez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, 30(4): 435-443. doi: 10.1016/s0306-3623(97)00268-1.
- Battista, T., Colotti, G., Ilari, A., Fiorillo, A. (2020). Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Molecules*, 25(8): 1924. doi: 10.3390/molecules25081924.
- Buckner, F., Verlinde, C., La Flamme, A., Van Voorhis, W. (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11): 2592-2597. doi: 10.1128/AAC.40.11.2592.
- Burleigh, B. y Andrews, N. (1995). A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca^{2+} -signaling factor for mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(10): 5172-5180. doi: org/10.1074/jbc.270.10.5172.
- Chan-Bacab, M. J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Durán-García, R., Peña-Rodríguez, L. M. (2003). Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3): 243-247. doi: 10.1016/s0378-8741(03)00011-4.

Chan-Bacab, M. J. y Peña-Rodríguez, L. M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18(6): 674-688. doi: 10.1039/b100455g.

Docampo, R. (2001). Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, 7(12): 1157-1164. doi: 10.1074/jbc.274.47.33609.

Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Drier-Jonas, S., Jiménez-Arellanes, M. A. (2017). Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12): 1105-1110. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.10.016.

Liñares, G., Ravaschino, E., Rodríguez, J. (2006). Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 13(3): 335-360. doi: 10.2174/092986706775476043.

Muelas-Serrano, S., Le-Senne, A., Fernández-Portillo, C., Nogal, J. J., Ochoa, C., Gómez-Barrio, A. (2002). In vitro and in vivo Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4): 553-557. doi: 10.1590/s0074-02762002000400019.

Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. J., Gómez-Barrio, A. (2000). Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 86(12): 999-1002. doi: 10.1007/pl00008532.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17): 5421-5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

PAHO (Pan American Health Organization) (2020). *Chagas in the Americas*. (https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13566:chagas-in-americas&Itemid=40721&lang=en). Revisado el 7 de diciembre de 2020.

Requena, J., Iborra, S., Carrión, J., Alonso, C., Soto, M. (2004). Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(9): 1505-1517. doi: 10.1517/14712598.4.9.1505.

Rojó-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*, 154: 605-612. doi: 10.24875/GMM.18004515.

Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., De Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medina, J., Fernández-Santos, N. A., Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 59(3): 6-16.

Tchokouaha, Y., Lauve, R., Appiah-Opong, R., Tsouh Fokou, P. V., Tsabang, N., Fekam Boyom, F., Nyarko, A. K., Wilson, M. D. (2018). Marine algae as source of novel antileishmanial drugs: A review. *Marine Drugs*, 15(11): 323. doi: 10.3390/md15110323.

Tempone, A., Martins de Oliveira, C., Berlinck, R. (2011). Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Medica*, 77(6): 572-585. doi: 10.1055/s-0030-1250663.

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6: 750. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.

Vieira, P., Mafezoli, J., Pupo, M., Fernandes, J. B., Da Silva, M., De Albuquerque, S., Oliva, G., Pavao, F. (2001). Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from Rutales. *Pure and Applied Chemistry*, 73(3): 617-622. doi.org/10.1351/pac200173030617.

Zuccotto, F., Zvelebil, M., Brun, R., Chowdhury, S., Di Lucrezia, R., Leal, I., Maes, L., Ruiz-Pérez, L., González Pacanowska, D., Gilbert, I. (2001). Novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36(5): 395-405. doi.org/10.1016/S0223-5234(01)01235-1.

Índice de autores

Almanza Pérez, Julio César

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Arias Durán, Luis

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Ávila Villarreal, Gabriela María

Unidad Especializada en I+D+i en Calidad de Alimentos y Productos Naturales, Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, A. C. y Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit.

Chan Bacab, Manuel Jesús

Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche.

Déciga Campos, Myrna

Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

Dzul-Beh, Ángel de Jesús

Unidad de Investigación Médica Yucatán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Yucatán.

Estrada Soto, Samuel Enoch

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Flores Flores, Angélica

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Flores Sáenz, José L. Eduardo

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Gallardo Ortiz, Itzell Alejandra

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Giacoman Martínez, Abraham

Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional.

González Trujano, María Eva

Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

Jaimez Melgoza, Ruth

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez Vargas, David

Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

Molina Salinas, Gloria María

Unidad de Investigación Médica Yucatán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Yucatán.

Montaño Pérez, Candy Andreína

Unidad Especializada en I+D+i en Calidad de Alimentos y Productos Naturales, Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, A. C. y Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit.

Navarrete Vázquez, Gabriel

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Rivera Cerecedo, Claudia Verónica

“Unidad Académica Bioterio” del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Sánchez Recillas, Amanda

Ammar-Te Sano Cosmética Natural Científica.

Uc-Cachón, Andrés Humberto

Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades 1, Mérida, Yucatán.

Ventura Martínez, Rosa

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Villalobos Molina, Rafael

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Yáñez Ibarra, Guadalupe

Unidad Especializada en I+D+i en Calidad de Alimentos y Productos Naturales, Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, A. C. y Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit.

***Métodos de bioevaluación
de compuestos bioactivos*** se terminó
de editar en el mes de diciembre de 2023,
en la Sección de Producción Editorial
de la UAM-Iztapalapa.

Corrección
Ma. Guadalupe Olvera Arellano

Formación
Nancy Flores Rodríguez



En los últimos 25 años México ha incrementado considerablemente su investigación pública en el área de desarrollo de fármacos. En este sentido, la Química, la Farmacia, la Farmacología y la Farmacognosia se han integrado de forma exitosa para la obtención y evaluación de moléculas bioactivas. Así por ejemplo, en México la Farmacognosia ha crecido importantemente; aprovechando la riqueza herbolaria de nuestro país, numerosos grupos de trabajo están aislando y caracterizando los principios activos que se encuentran en las plantas medicinales, algas marinas, insectos y hongos con potencial utilidad terapéutica. Adicionalmente, con la reciente incorporación de métodos computacionales en el área de Química-Farmacéutica se puede realizar un cernimiento más rápido de potenciales estructuras químicas con actividad específica hacia ciertos blancos moleculares. El objetivo del presente libro es integrar una serie de técnicas y modelos experimentales para la identificación de compuestos con actividad biológica.

ISBN 978-607-28-3025-7

