Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 37 Número 1 (2020) **SEMESTRAL**

INDEX

Obituary Anunciacion Lafuente Giménez, Professor of Toxicology at the University of Vigo..... 1
EDITORIAL 2
Pallardo-Fernández I, Muñoz-Rodríguez JR, González-Martín C, Alguacil LF. **Human clusterin gene polymorphisms associated with substance use disorders**.....3
Retuerto-Figueroa MG, Ramos-Llica E, Gorriti-Gutiérrez AR, Gallardo-Jugo T, Ortega-Romero E, Calixto-Cotos M, Cosquillo-Rafael M, Fuertes-Ruitón C, Quispe-Jacobo F, Villafuerte-Montes U. **Pharmacognostic, antioxidant and cytotoxic study of Sinningia warmingii "papa madre"**..... 6
Narváez M, Astudillo A , García N, Moscoso D, Mejía D, Vásquez P, Maza D, Bailón N. **Genotoxic effect of PM2.5 particulate material collected in the urban area of the city of Cuenca - Ecuador in the Chinese hamster ovary cells line CHO-K1**..... 11
Gabrielli TA, Voitzuk AP, Greco V, Osorio P, Alava Arteaga JR, Juárez FJ, Taiman JN, Gallo IM. **Bilateral radial paresis secondary to chronic lead exposure: a case report**..... 17
Ugokwe CU, Okafor F C, Okeke PC, Ezewudo BI, Olagunju TE. **Induction of Genetic Alterations and Oxidative Stress in Giant African Land Snail (*Limicolaria aurora*) Exposed to Municipal Waste Leachate** 19
Álvarez-Freire I, Cabarcos Fernández P, Regenjo Vázquez M, Tabernero Duque MJ, Bermejo Barrera AM.. **Toxicological investigation in suicides from samples received at the Forensic Toxicology Service of the University of Santiago de Compostela in the period 2009-2018**..... 26
Lugo-Vargas AF , Chaves-Silva DC, Quevedo-Buitrago WG, Martínez-Suárez JF. **Synthetic cathinones: a review of the current landscape and analytical detection strategies**.....31
Hernández C, Álvarez M. **image analysis by segmentation of histopathology produced by acrylamide in the adult zebrafish *(Danio rerio)***.....41
Béjar Calzada CM, Pi-Figueres Valls M2, Clemente Rodríguez C, PallàsVillaronga O, Arnau Barrés I, Calpe Perarnau X, Cirera Lorenzo I, Supervía Caparrós A. **Characteristics of acute poisonings in elderly patients according to age** 44
Duque JJ, Caicedo J, Estrada AF, Berrouet MC, Zuluaga-Gómez M. **Experience in the management of intoxications by Beta-blockers and Calcium-antagonists: case series and review**..... 48
Goya-Jorge E, de Julián-Ortiz JV, Gozalbes R, **Protection against Endocrine Disruption through Quantitative Structure-Activity Relationship modelling**.....55

ÍNDICE

Obituario Anunciacion Lafuente Giménez, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Vigo..... 1
EDITORIAL..... 2
Pallardo-Fernández I, Muñoz-Rodríguez JR, González-Martín C, Alguacil. **Asociación entre polimorfismos del gen humano de clusterina y trastornos por consumo de sustancias**.....3
Retuerto-Figueroa MG, Ramos-Llica E, Gorriti-Gutiérrez AR, Gallardo-Jugo T, Ortega-Romero E, Calixto-Cotos M, Cosquillo-Rafael M, Fuertes-Ruitón C, Quispe-Jacobo F, Villafuerte-Montes U. **Estudio farmacognóstico, antioxidante y citotóxico de Sinningia warmingii "papa madre"**..... 6
Narváez M, Astudillo A , García N, Moscoso D, Mejía D, Vásquez P, Maza D, Bailón N. **Efecto Genotóxico del material particulado PM2.5 recolectado en la zona urbana de Cuenca - Ecuador sobre la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1**..... 11
Gabrielli TA, Voitzuk AP, Greco V, Osorio P, Alava Arteaga JR, Juárez FJ, Taiman JN, Gallo IM. **Paresia radial bilateral secundaria a exposición crónica a plomo: reporte de un caso**.....17
Videla C.G., Las Heras M., Ayala Y., San Román E. **Inducción de alteraciones genéticas y estrés oxidativo en el Caracol de Tierra Africano Gigante (*Limicolaria aurora*) expuesto al lixiviado de residuos municipales**.....19
Álvarez-Freire I, Cabarcos Fernández P, Regenjo Vázquez M, Tabernero Duque MJ, Bermejo Barrera AM. **Investigación toxicológica en suicidios a partir de las muestras recibidas en el Servicio de Toxicología Forense de la Universidad de Santiago de Compostela en el periodo 2009-2018**.....26
Lugo-Vargas AF , Chaves-Silva DC, Quevedo-Buitrago WG, Martínez-Suárez JF. **Catinonas sintéticas: una revisión del panorama actual y las estrategias de detección analítica**.....31
Hernández C, Álvarez M. **Un analisis de imagen por segmentación de la histopatología producida por la acrilamida en el pez cebra adulto (*Danio rerio*)**..... 41
Béjar Calzada CM, Pi-Figueres Valls M2, Clemente Rodríguez C, PallàsVillaronga O, Arnau Barrés I, Calpe Perarnau X, Cirera Lorenzo I, Supervía Caparrós A. **Características de las intoxicaciones agudas en pacientes ancianos según la edad**.....44
Duque JJ, Caicedo J, Estrada AF, Berrouet MC, Zuluaga-Gómez M. **Experiencia en el manejo de intoxicaciones por Betabloqueadores y Calcioantagonistas: serie de casos y revisión de la literatura**..... 48
Goya-Jorge E, de Julián-Ortiz JV, Gozalbes R, **Revisión de los modelos computacionales que relacionan la estructura química con la disrupción del sistema endocrino**.....55

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/Excerpta Medica y Chemical Abstracts
Indexed in Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/Excerpta Medica and Chemical Abstracts

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 37 (1), 1-68 (2020)
ISSN 0212-7113

Calidad de Revistas Científicas Españolas FECYT 2016
Certificado de Excelencia (2016-2019)

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGIA

La **Revista de Toxicología** de la Asociación Española de Toxicología tiene el objetivo de publicar información actualizada sobre investigaciones originales en Toxicología en castellano o en inglés y revisada por pares. Se publican artículos experimentales y de revisión de cualquier especialidad de la Toxicología, como Toxicología Alimentaria, Ambiental, Clínica, Forense, Veterinaria, Experimental y Métodos Alternativos así como en Educación en Toxicología. La revista aborda los aspectos de desarrollo y validación de nuevos métodos incluyendo estudios *in vivo* y estudios *in vitro*. Se publican así mismo las actas de congresos de la Asociación Española de Toxicología y Jornadas de Toxicología. El alcance de la revista abarca desde mecanismos moleculares y celulares hasta las consideraciones de las evidencias experimentales para la evaluación de riesgos.
Es una revista electrónica diseñada para facilitar la divulgación de la investigación actual en el campo de la Toxicología.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Resumen actual de características y normativas

El objetivo fundamental de la Asociación Española de Toxicología es el de propiciar la relación y cooperación entre sus miembros, y coordinar sus esfuerzos a fin de contribuir al desarrollo y difusión de los conocimientos en las diferentes áreas de la toxicología. Su Estatuto fundacional fue aprobado oficialmente el 15 de enero de 1980.
Toda persona interesada en pertenecer a esta Asociación deberá cumplimentar una ficha de inscripción, refrendada por la Junta Directiva. La cuota anual (60 €) se abona por domiciliación bancaria, Esta cuota da derecho a la recepción de la Revista de Toxicología cuando se publique una versión impresa, y a la reducción de la cuota de inscripción en los congresos y jornadas organizados por la asociación. Una vez admitidos los nuevos asociados recibirán un titulo y, periódicamente, las actas de las reuniones y comunicación de actividades con carácter nacional e internacional que pueden ser de interés.
La asociación promueve la celebración, cada dos años, del Congreso Español de Toxicología, cuya organización puede delegar. Además se ha establecido la celebración periódica de seminarios o mesas redondas organizadas por grupos de trabajo. Cada reunión de este tipo será monotemática y abierta a personas no pertenecientes a la Asociación, y se desarrollará en diferentes ciudades españolas.

Asociación Española de Toxicología

Secretaría de la AETOX
Emma Martín López Área de Toxicología
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
Tel: 86888 7022/9311 e-mail: emmaml@um.es

Copyright

El envío de un manuscrito implica: que no ha sido publicado anteriormente (excepto como abstract, o como parte de una conferencia o tesis); que no está considerándose su publicación en otra revista, libro, etc.; que su publicación ha sido aprobada por todos los coautores, si los hay; que, cuando y si el manuscrito es aceptado para su publicación, los autores están de acuerdo en la cesión automática del Copyright a la editorial y que el manuscrito no será publicado en ninguna otra parte ni en ningún otro idioma sin permiso de la editorial.

Todos los artículos publicados en esta revista están protegidos por Copyright, que cubre los derechos exclusivos de reproducción y distribución del artículo (p. ej. como separatas) y también los derechos de traducción, Ningún contenido de la revista puede ser reproducido, fotocopiado, microfilmado o almacenado en bases de datos electrónicas, videodiscos, etc., sin el permiso escrito de los titulares del Copyright.

El uso de nombres descriptivos, de marcas, marcas registradas, etc., incluso si no se identifican especialmente, no implica que estos nombres no estén protegidos por las leyes y regulaciones correspondientes.

Los trabajos se enviarán a través de la plataforma de la revista: ***http://revista.aetox.es***

El Equipo Editorial: revista@aetox.es

Directora:
Dra. Guillermina Font Pérez. Universitat de València.
Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal.
Avda. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Valencia

Subdirectora:
Dra. Emilia Ferrer García. Universitat de València

Editores asociados:
Dra. María P. Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura
Dr. Juan Carlos Rios Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile

D.L.: C0-723-83.
S.V.: 91051 R.
ISSN: 0212-7113

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/ Excerpta Medica y Chemical Abstracts

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 37 Número 1 (2020) **SEMESTRAL**

INDEX

Obituary Anunciacion Lafuente Giménez, Professor of Toxicology at the University of Vigo..... 1
EDITORIAL 2
Pallardo-Fernández I, Muñoz-Rodríguez JR, González-Martín C, Alguacil LF. **Human clusterin gene polymorphisms associated with substance use disorders**.....3
Retuerto-Figueroa MG, Ramos-Llica E, Gorriti-Gutiérrez AR, Gallardo-Jugo T, Ortega-Romero E, Calixto-Cotos M, Cosquillo-Rafael M, Fuertes-Ruitón C, Quispe-Jacobo F, Villafuerte-Montes U. **Pharmacognostic, antioxidant and cytotoxic study of Sinningia warmingii "papa madre"**..... 6
Narváez M, Astudillo A , García N, Moscoso D, Mejía D, Vásquez P, Maza D, Bailón N. **Genotoxic effect of PM2.5 particulate material collected in the urban area of the city of Cuenca - Ecuador in the Chinese hamster ovary cells line CHO-K1**..... 11
Gabrielli TA, Voitzuk AP, Greco V, Osorio P, Alava Arteaga JR, Juárez FJ, Taiman JN, Gallo IM. **Bilateral radial paresis secondary to chronic lead exposure: a case report**..... 17
Ugokwe CU, Okafor F C, Okeke PC, Ezewudo BI, Olagunju TE. **Induction of Genetic Alterations and Oxidative Stress in Giant African Land Snail (*Limicolaria aurora*) Exposed to Municipal Waste Leachate** 19
Álvarez-Freire I, Cabarcos Fernández P, Regenjo Vázquez M, Tabernero Duque MJ, Bermejo Barrera AM.. **Toxicological investigation in suicides from samples received at the Forensic Toxicology Service of the University of Santiago de Compostela in the period 2009-2018**..... 26
Lugo-Vargas AF , Chaves-Silva DC, Quevedo-Buitrago WG, Martínez-Suárez JF. **Synthetic cathinones: a review of the current landscape and analytical detection strategies**.....31
Hernández C, Álvarez M. **image analysis by segmentation of histopathology produced by acrylamide in the adult zebrafish *(Danio rerio)***.....41
Béjar Calzada CM, Pi-Figueres Valls M2, Clemente Rodríguez C, PallàsVillaronga O, Arnau Barrés I, Calpe Perarnau X, Cirera Lorenzo I, Supervía Caparrós A. **Characteristics of acute poisonings in elderly patients according to age** 44
Duque JJ, Caicedo J, Estrada AF, Berrouet MC, Zuluaga-Gómez M. **Experience in the management of intoxications by Beta-blockers and Calcium-antagonists: case series and review**..... 48
Goya-Jorge E, de Julián-Ortiz JV, Gozalbes R, **Protection against Endocrine Disruption through Quantitative Structure-Activity Relationship modelling**.....55

ÍNDICE

Obituario Anunciacion Lafuente Giménez, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Vigo..... 1
EDITORIAL..... 2
Pallardo-Fernández I, Muñoz-Rodríguez JR, González-Martín C, Alguacil. **Asociación entre polimorfismos del gen humano de clusterina y trastornos por consumo de sustancias**.....3
Retuerto-Figueroa MG, Ramos-Llica E, Gorriti-Gutiérrez AR, Gallardo-Jugo T, Ortega-Romero E, Calixto-Cotos M, Cosquillo-Rafael M, Fuertes-Ruitón C, Quispe-Jacobo F, Villafuerte-Montes U. **Estudio farmacognóstico, antioxidante y citotóxico de Sinningia warmingii "papa madre"**..... 6
Narváez M, Astudillo A , García N, Moscoso D, Mejía D, Vásquez P, Maza D, Bailón N. **Efecto Genotóxico del material particulado PM2.5 recolectado en la zona urbana de Cuenca - Ecuador sobre la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1**..... 11
Gabrielli TA, Voitzuk AP, Greco V, Osorio P, Alava Arteaga JR, Juárez FJ, Taiman JN, Gallo IM. **Paresia radial bilateral secundaria a exposición crónica a plomo: reporte de un caso**.....17
Videla C.G., Las Heras M., Ayala Y., San Román E. **Inducción de alteraciones genéticas y estrés oxidativo en el Caracol de Tierra Africano Gigante (*Limicolaria aurora*) expuesto al lixiviado de residuos municipales**.....19
Álvarez-Freire I, Cabarcos Fernández P, Regenjo Vázquez M, Tabernero Duque MJ, Bermejo Barrera AM. **Investigación toxicológica en suicidios a partir de las muestras recibidas en el Servicio de Toxicología Forense de la Universidad de Santiago de Compostela en el periodo 2009-2018**.....26
Lugo-Vargas AF , Chaves-Silva DC, Quevedo-Buitrago WG, Martínez-Suárez JF. **Catinonas sintéticas: una revisión del panorama actual y las estrategias de detección analítica**.....31
Hernández C, Álvarez M. **Un analisis de imagen por segmentación de la histopatología producida por la acrilamida en el pez cebra adulto (*Danio rerio*)**..... 41
Béjar Calzada CM, Pi-Figueres Valls M2, Clemente Rodríguez C, PallàsVillaronga O, Arnau Barrés I, Calpe Perarnau X, Cirera Lorenzo I, Supervía Caparrós A. **Características de las intoxicaciones agudas en pacientes ancianos según la edad**.....44
Duque JJ, Caicedo J, Estrada AF, Berrouet MC, Zuluaga-Gómez M. **Experiencia en el manejo de intoxicaciones por Betabloqueadores y Calcioantagonistas: serie de casos y revisión de la literatura**..... 48
Goya-Jorge E, de Julián-Ortiz JV, Gozalbes R, **Revisión de los modelos computacionales que relacionan la estructura química con la disrupción del sistema endocrino**.....55

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 37 (1), 1-68 (2020)
ISSN 0212-7113

Calidad de Revistas Científicas Españolas FECYT | FUNDACIÓN ESPAÑOLA PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA | 2016
Certificado de Excelencia (2016-2019)

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

COMITÉ EDITORIAL/EDITORIAL BOARD

Directora/Editor In Chief

Guillermina Font Pérez. Universitat de Valencia. Spain.

Subdirectora/Deputy Editor-in-Chief

Emilia Ferrer García. Universitat de Valencia. Spain.

Editores Asociados/Associate Editor

Mª del Prado Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura. Spain.

Juan Carlos Ríos Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Consejo Editorial/Editorial Committee

Rafael Balaña Fouce. Universidad de León. Spain.

Ana Bermejo Barrera. Universidad de Santiago de Compostela. Spain.

Houda Berrada Ramdani. Universitat de Valencia. Spain.

Ana María Cameán Fernández. Universidad de Sevilla. Spain.

Mónica Fernández Franzón. Universitat de Valencia. Spain.

Fernando Gil Hernández. Universidad de Granada. Spain.

Ángeles Jos Gallego. Universidad de Sevilla. Spain.

David Hernández Moreno. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid. Spain.

Arantxa Martínez Caballero. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

Emma Martínez López. Universidad de Murcia. Spain.

Ana María Molina López. Universidad de Cordoba. Spain.

Miguel A. Mora. Texas A&M University. Estados Unidos.

Ana Isabel Morales Martín. Universidad de Salamanca. Spain.

Rosario Moyano Salvago. Universidad de Cordoba. Spain.

Marcos Pérez López. Universidad de Extremadura. Spain.

Silvia Pichardo Sánchez. Universidad de Sevilla. Spain.

Ana Isabel Prieto Ortega. Universidad de Sevilla. Spain.

María José Ruiz Leal. Universitat de Valencia. Spain.

Gianni Sagratini. Università degli Studi di Camerino.

Francisco Soler Rodríguez. Universidad de Extremadura. Spain.

Sabina Stranno-Rossi. Universita Cattolica Sacro Cuore. Roma.

María Jesús Tabernero Duque. Universidad de Santiago de Compostela. Spain.

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/ Excerpta Medica y Chemical Abstracts

EN RECUERDO A NUESTRA COMPAÑERA ANUNCIACIÓN LAFUENTE

Anunciación Lafuente Giménez, miembro de la Asociación Española de Toxicología (AETOX) desde comienzo de los años noventa, vicepresidenta de la AETOX desde 2007 a 2013, ha sido una de esas personas cuyo paso por la vida ha dejado una profunda huella tanto en sus amigos, compañeros de universidad y discípulos a los que formó con gran dedicación durante su vida profesional.

Anunciación Lafuente, para siempre Nunci, estudió Biología en la Universidad de Santiago de Compostela y desarrolló principalmente su labor docente e investigadora en las Facultades de Veterinaria de Lugo y de Biología de la Universidad de Vigo en el Campus da Auga de Orense, siempre impartiendo docencia en Toxicología, un área de conocimiento abundada de profesionales que entonces no solían entender qué hacía un biólogo en ella. La fuerte personalidad de Nunci se caracterizó profesionalmente por su competencia profesional, su extraordinaria capacidad de trabajo, su elevado sentido de la amistad y del compañerismo y su rebeldía. Desde su Tesis Doctoral en 1991 en neuroendocrinología Nunci abordó la ciencia desde la perspectiva de la experimentación animal con un enfoque aplicado a la seguridad alimentaria y ambiental, sus trabajos, primero en endocrinología experimental, resultados de su Tesis doctoral, y después incluyendo la exposición a tóxicos ambientales como el cadmio y ciertos plaguicidas organoclorados, hizo que fuera una de las primeras investigadoras en España en utilizar el término de toxicidad neuroendocrina para determinados tipos de compuestos. Más adelante, y con una visión clara del riesgo de exposición a estos tóxicos y de su repercusión en la seguridad del consumidor, comenzó una línea puntera sobre la toxicidad del perfluoroctano sulfonato (PFOS) de extraordinaria actualidad y que lamentablemente tuvo que interrumpir por su enfermedad.

Nunci ejerció desde 1995 como Profesora Titular primero y a partir de 2006 como Catedrática de Toxicología en la Universidad de Vigo impartiendo clases de Toxicología Alimentaria a los alumnos de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, hasta la aparición de su enfermedad. Nunci accedió a la Vicepresidencia de la AETOX en 2007 a 2013, representando con su prestigio personal a nuestra Asociación en todos los eventos nacionales e internacionales en los que participó. Para dar una idea de lo mucho que se llegaba a apreciar a Nunci en su entorno académico valga el detalle de que durante los dos años que ha durado su enfermedad han acudido con regularidad a su laboratorio no solamente muchos de sus compañeros de Facultad y de la Universidad, sino también –y a pesar de la distancia generacional– estudiantes que querían saber cuando volvería a reintegrarse en la docencia en plenas condiciones. Pero no fue así, los que seguimos su convalecencia de cerca, vimos en varias ocasiones como nos hacía creer que las cosas iban mejor de lo que eran en realidad. Hubo un momento en que pareció que realmente sería así, pero desafortunadamente la enfermedad nos la arrebató.

Nunci nos dejó el pasado 31 de diciembre de 2019 tras dos largos años de una enfermedad que llevó con la dignidad de una luchadora infatigable. Sus amigos, sus compañeros, discípulos y familiares nos quedamos sin ella. Amiga Nunci, el vacío que dejas a los que creemos que te conocimos bien se echa mucho de menos, tu curiosidad y respeto para los que tenían creencias opuestas a las tuyas, con los que te gustaba entablar discusión y que ahora te añoran, tu sentido del humor y tu sabio magisterio en el laboratorio, en el que como buena maña difícilmente dabas tu brazo a torcer se recordarán entre tus discípulos. Nos has dejado demasiado pronto, justo en el momento en el que la experiencia y la madurez dan sus mejores frutos. Sin embargo, permanecerá siempre en nuestro recuerdo tu personalidad inquebrantable, la lealtad a tus amigos y la generosidad con discípulos y compañeros, tu vasto conocimiento y tu buen hacer. Donde quiera que te encuentres ahora, descansa en paz.

David Ordóñez Escudero: CU Toxicología jubilado de la Universidad de León

Rafael Balaña Fouce: CU Toxicología de la Universidad de León

Revista de Toxicología

EDITORIAL

En estos tiempos de pandemia, consideramos una prioridad hacer referencia al momento que nos ocupa y preocupa, porque la Revista de Toxicología trata temas de salud, y aunque este hecho no sea directamente relevante desde el ámbito de la virología, y a primera vista, no parezca tener relación con el síndrome respiratorio agudo SARS-CoV-2 entre otras manifestaciones de la enfermedad, si se presentan algunas consecuencias relacionadas con la Toxicología.

La epidemia provocada por la Covid-19 variará nuestros hábitos, así como la utilización de diversos materiales potencialmente tóxicos se verá incrementada. Algunas intoxicaciones como las producidas por productos de limpieza han aumentado, originando diversos cuadros toxicológicos. Y posteriores consecuencias relacionadas con potenciales agentes tóxicos se irán poniendo de manifiesto en un futuro.

Por ello como profesionales de la Toxicología tenemos la obligación de seguir velando por la salud de los organismos vivos y los ecosistemas desde las diferentes ramas de la Toxicología.

Queremos una vez más dar las gracias a los investigadores que confían en la difusión de sus investigaciones a la Revista de Toxicología y a los revisores que con su experiencia contribuyen a la calidad de las publicaciones.

Os animamos a seguir comunicando vuestros resultados y conclusiones a través de la Revista de Toxicología desde donde sirven a profesionales de la salud, docentes y estudiantes, así como a la población en general de forma fácil al estar los ejemplares disponibles.

Animo a todas y todos, cuidaros y esperamos seguir recibiendo noticias vuestras.

EL EQUIPO EDITORIAL

Human clusterin gene polymorphisms associated with substance use disorders

Pallardo-Fernández I[1], Muñoz-Rodríguez JR[2], González-Martín C[1], Alguacil LF[1,]*

[1] *Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, CEU Universities*
[2] *Unidad de Investigación Traslacional, Hospital General Universitario de Ciudad Real*

Abstract: Previous work revealed that the levels of clusterin in biological fluids are associated with loss of control over eating and with the duration and intensity of tobacco use in humans. In non-human primates, chronic cocaine upregulates clusterin gene expression in the nucleus accumbens, a key area in addiction. All these findings have led to suggest that clusterin could be associated with the presence of different kind of addictive behaviours. In this work possible associations between clusterin gene polymorphisms and drug use disorder were studied. Forty-four selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the clusterin gene were studied in DNA samples from 499 subjects diagnosed of substance use disorder (addicted to alcohol, cocaine or both) and 500 control subjects. Genotyping was performed by using a multiplexing assay and data were analysed with logistic regression. Four SNPs (rs867231, rs867232, rs9331896 and rs11787077) were found significantly associated with the presence of substance use disorder. These associations further extend the hypothesis that clusterin could be a relevant protein in addiction.

Keywords: Clusterin; Substance Use Disorder; Addiction; Alcohol; Cocaine.

Resumen: ***Asociación entre polimorfismos del gen humano de clusterina y trastornos por consumo de sustancias***

Estudios previos han encontrado una asociación entre los niveles de clusterina en fluidos biológicos y la pérdida de control sobre la ingesta, así como entre dichos niveles y la duración e intensidad del consumo de tabaco. Por otra parte, la administración crónica de cocaína a primates no humanos incrementa la expresión del gen de clusterina en el Núcleo Accumbens, una región cerebral clave en las adicciones. Estos antecedentes sugieren que la clusterina podría estar implicada en distintos tipos de trastornos adictivos. En este trabajo se han estudiado posibles asociaciones entre polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) del gen de clusterina y trastornos por consumo de sustancias (TCS). Se genotiparon 44 SNP en muestras de ADN procedentes de 499 sujetos diagnosticados de TCS (adictos al alcohol, cocaína o ambas drogas) y 500 sujetos control. Para la secuenciación y el genotipado se utilizó la plataforma Sequenom y el análisis estadístico de los resultados se realizó mediante regresión logística. Se detectó una asociación significativa entre 4 SNP (rs867231, rs867232, rs9331896 y rs11787077) y la presencia de TCS. Estos resultados apoyan la hipótesis de que clusterina es una proteína relevante en las adicciones.

Palabras Clave: clusterina, trastornos por consume de sustancias, addicción, alcohol, cocaina.

Introduction

Recent proteomic studies performed in morbid obese patients revealed that the plasma concentration of clusterin positively correlated with loss of eating control, one of the main dimensions of food craving in these subjects (Rodríguez-Rivera et al., 2019). Clusterin is a multifunction protein that was already known to mediate the effects of both leptin and ghrelin on appetite (Gil et al., 2013), therefore the possibility exists that changes in the levels or function of this protein could be potentially associated to pathological conditions where problematic eating behaviours are expected to play a key role, i.e. the food addiction phenotype of obesity (Davis et al., 2011). This association could extend to substance use disorders (SUD), if we bear in mind the close relationship reported between the neurobiology of food and drug addiction (Volkow et al., 2013). According to this idea, previous studies in non-human primates revealed that chronic treatment with cocaine alters clusterin gene expression in the nucleus accumbens, a brain area deeply involved in different kind of addictions (Freeman et al., 2001). Recent reports of human studies are in agreement with these findings: thus, salivary levels of clusterin in nicotine addicts depended on the length of tobacco use and the number of daily cigarettes consumed, and decreased after smoking cessation (Pallardo-Fernández et al., 2018). Up to our knowledge the possible consequences of genetic variability in the clusterin gene on the risk of developing addictions have not been studied, despite the fact that this variability is known to be relevant in other diseases where clusterin is also involved, i.e. Alzheimer's disease (Foster et al., 2019). Accordingly, this work has explored possible associations between selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the human clusterin gene and SUD.

Materials and Methods

Genetic variants of the clusterin gene were studied in 499 subjects diagnosed of SUD according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4th ed., text rev.; American Psychiatric Association, 2000) and 500 control subjects (table 1). The SUD group included patients that abused alcohol, cocaine or both drugs with predomination of males, which is in accordance with the reported sex-biased proportion of addicts that seek treatment (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2019).

Table 1. *Main characteristics of the subjects included in the study. Numbers represent means ± SD.*

	Drug addicts	**Controls**
Sex (females : males)	108 : 391	250 : 250
Age (years)	44.4 ± 10.6	40.2 ± 3.9
Body mass index (kg/m^2)	25.4 ± 4.6	26.2 ± 4.4
Length of drug consumption (years)	21.8 ± 11.4	
Severity of drug dependence (SDSS/DSM-IV score)	7.5 ± 3.1	

DNA samples were collected and processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the ethical and scientific committees of the biobanks involved and San Pablo CEU University (USP 191-17). Samples from drug addicts were provided by the Spanish Biobank of the Addiction Disease Network (Biobanco RTA), integrated in the Valencian Biobanking Network (Spain); these samples were prepared by extracting genomic DNA from peripheral blood using the Real Blood DNA kit (Durviz-Real Laboratory SL, Valencia, Spain) following manufacturer's instructions. Briefly, the protocol consists in a four-step process: lysis of red blood cells, lysis of white blood cells followed by RNA digestion, protein precipitation that leaves DNA in the supernatant, and DNA concentration and purification by isopropanol precipitation. The quantity and quality of the obtained DNA was measured by spectrophotometry using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington DE, USA). DNA samples were taken to a final concentration of 50 ng/µl

*e-mail: lfalguacil@ceu.es

and stored at -80 ºC. Samples from control subjects were provided by the National DNA Bank Carlos III (BNADN, Spain); genomic DNA was also obtained in this facility from peripheral blood, using the Gentra Puregene Blood kit (Qiagen, Vedbaek, Denmark). The steps were similar to those followed in the former procedure: red blood cell lysis followed by white cell lysis, protein precipitation and DNA precipitation with isopropanol. The DNA obtained was washed with 70% ethanol, resuspended in DNA Hydration Solution (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 7-8), normalized to 100 ng/µl and stored at -80 ºC. The concentration and purity of the DNA was determined with a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington DE, USA). A ratio of 260nm/280nm absorbances higher than 1.8 was considered indicative of optimal quality, and integrity was confirmed by loading 1 µl of the samples in 0.7% agarose gel to check the presence of a single band after electrophoresis.

Genomic DNA samples were sent to the Spanish National Center for Genotyping (CEGEN-PRB3-ISCIII) to study 44 SNPs of the clusterin gene with a minor allele frequency greater than 5% that were selected from the dbSNP database (National Center for Biotechnology Information NCBI, USA) (table 2). Samples were normalized to 20 ng DNA/µl with Milli Q water in a Evo Freedom liquid handling robot (Tecan, Männedorf, Switzlerand), then analysed by using a multiplexing platform (Sequenom iPLEX Gold, Agena Bioscience, San Diego CA, USA) based on a simple single-base primer extension assay and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF) for allelic discrimination. Briefly, polymerase chain reaction (PCR) primers were designed in a region of approximately 100 base pairs around each SNP of interest, and an extension primer was designed immediately adjacent to the SNP; PCR products were single-nucleotide-extended using dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) with some of their atoms substituted in order to generate weight differences between alleles. Mass spectrometry was then used for allele differentiation by weight (Ragoussis et al., 2006).

The genotypes of drug addicts were compared to those of controls to investigate SNPs associated with SUD by using logistic regression. The model obtained fitted with data as shown by the Log Likelihood ratio test ($p = 4.39x10^{-17}$), Nagelkerke's R^2 (0.31) and the percentage of subjects properly classified by the adjusted logistic model (70%). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Table 3 depicts four clusterin gene polymorphisms and the corresponding genotypes that were found to be significantly associated with the presence of SUD. As it is shown, three of these SNPs were located within the signal peptide exon, while the remaining one was intronic.

Discussion

The results obtained clearly show the existence of associations between several clusterin gene variants and the presence of SUD. Some Odds Ratios reached high values, which is expected when the corresponding genotype is highly predominant in the total sample (Cerda et al., 2013). These associations further extend the hypothesis that clusterin could be a relevant protein in addiction, as it was suggested by the antecedents previously commented (Freeman et al., 2001; Pallardo-Fernández et al., 2018; Rodríguez-Rivera et al., 2019). A biological interpretation of these results cannot be yet provided, bearing in mind that the functional consequences of the genetic variants detected are largely unknown and thus require additional, specific work to be fully understood. Despite of this, it is important to note that rs867232, rs867231 and rs9331896 could impact the signal peptide function, and hence could influence clusterin transportation and cellular location (Jarjanazi et al., 2008). By turn, the intronic SNP rs11787077 could affect splicing.

A neuroprotective role has been proposed for clusterin after being studied in models of neuronal damage induced by ischemia (May et al., 1992), β-amyloid deposition (Boggs et al., 1996), excitotoxicity (Park et al., 2007) and trauma (Huang et al., 2016). Accordingly, those genotypes linked to altered clusterin function could affect the vulnerability to suffer different diseases related with neuronal injury, such as dementia and drug addiction. In fact, the latter parallelism is observed in the case of rs9331896, since the T allele is associated with higher risk of both SUD and Alzheimer's disease (Lambert et

Table 2. *SNPs selected for this study. MAF, Minor Allele Frequency.*

SNP	Locus	MAF	Type	Wild allele
rs4732729	15319638	0.4726	A/C	C
rs9331936	15315658	0.0653	A/C	A
rs9331931	15316250	0.1478	C/G	C
rs9331930	15316440	0.2636	A/C	C
rs9331923	15319409	0.0581	C/T	C
rs7812347	15318331	0.2640	A/G	A
rs60056423	15317351	0.1480	A/C	C
rs66969288	15317786	0.1480	A/G	G
rs76604252	15319510	0.0597	C/T	T
rs9331908	15321764	0.4734	A/G	G
rs73679246	15321302	0.0715	A/G	G
rs9331888	15327008	0.3335	C/G	G
rs34109053	15328743	0.2198	A/G	G
rs72417182	15329066:15329067	0.2961	--/AG	-
rs17515931	15328342	0.2105	A/C	C
rs73231005	15328924	0.2109	C/G	C
rs867230	15326649	0.3247	A/C	C
rs545243	15328286	0.0603	G/T	G
rs546076	15328357	0.0529	C/T	C
rs867232	15325329	0.1290	C/T	T
rs9331892	15326151	0.0571	C/T	C
rs867231	15325538	0.1264	C/G	C
rs2070926	15325967	0.2352	C/G	C
rs9331896	15325832	0.3828	T/C	C
rs4732731	15334320	0.0673	C/T	C
rs9331950	15312828	0.1030	C/T	C
rs9331949	15312832	0.0966	A/G	A
rs9331942	15313260	0.1200	C/T	T
rs73679247	15323778	0.0731	A/C	A
rs1532277	15324327	0.2360	C/T	C
rs1532278	15324461	0.2636	C/T	C
rs1982229	15332745	0.2342	C/T	T
rs2279590	15314399	0.2406	A/G	G
rs3087554	15313588	0.2420	A/G	G
rs11787077	15323458	0.3786	C/T	T
rs10503814	15312721	0.0575	C/T	C
rs11136000	15322665	0.3782	C/T	T
rs1532276	15324303	0.3706	C/T	T
rs4236673	15323075	0.2346	A/G	G
rs7982	15320627	0.3355	C/T	C
rs9314349	15332348	0.2330	A/G	G
rs9331905	15322390	0.1348	A/G	A
rs9331902	15323947	0.0715	A/G	G
rs536332	15333913	0.3117	A/G	A

Table 3. *Clusterin gene variants significantly associated with drug use disorder. +, increased risk; -, decreased risk; OR = odds ratio; c.i. = 95% confidence interval.*

SNP	Locus	Association	Genotype	OR	c.i.
rs867232	Signal peptide exon	-	A_	0.24	0.06 – 1.00
			AA	0.12	0.03 – 0.50
rs867231	Signal peptide exon	+	G_	4.38	1.08 – 17.72
			GG	8.76	2.16 – 35.44
rs11787077	UTR / intron	+	T_	4.39	1.48 – 13.01
			TT	8.79	2.97 – 26.02
rs9331896	Signal peptide exon	-	C_	0.26	0.09 – 0.77
			CC	0.13	0.04 – 0.38

al., 2013), as well as other kinds of dementia (Nordestgaard et al., 2018). We did not find in the literature additional associations between the remaining three SNPs identified in our study and any other disease. All these findings strongly recommend further investigations on the role of clusterin gene variants and clusterin function in drug addiction.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Plan Nacional sobre Drogas, PNSD 2016I025), Spain. We want to particularly acknowledge the patients, the biobanks BNADN and Biobanco RTA (integrated in Valencian Biobanking Network) for its collaboration, as well as Prof. Santiago Angulo for helpful statistical advice. The genotyping service carried out at CEGEN-PRB3-ISCIII is supported by grant PT17/0019 of the PE I+D+i 2013-2016, funded by ISCIII and ERDF.

References

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., text rev.). Washington DC: American Psychiatric Association; 2000.
2. *Boggs LN, Fuson KS, Baez M, Churgay L, McClure D, Becker G, May PC* . Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. J. Neurochem. 1996; 67 (3), 1324-1327.
3. *Cerda J, Vera C, Rada G.* Odds ratio: theoretical and practical issues. Rev. Med. Chile 2013; 141, 1329-1335.
4. *Davis C, Curtis C, Levitan RD, Carter JC, Kaplan AS, Kennedy JL.* Evidence that 'food addiction' is a valid phenotype of obesity. Appetite 2011; 57 (3), 711-717.
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report 2019: Trends and Developments. Brussels: Publications Office of the European Union; 2019.
6. *Foster EM, Dangla-Valls A, Lovestone S, Ribe EM, Buckley N.* Clusterin in Alzheimer's disease: mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. Front. Neurosci. 2019; 13, 164.
7. *Freeman WM, Nader MA, Nader SH, Robertson DJ, Gioia L, Mitchell SM, Daunais JB, Porrino LJ, Friedman DP, Vrana KE.* Chronic cocaine-mediated changes in non-human primate nucleus accumbens gene expression. J. Neurochem. 2001; 77 (2), 542-549.
8. *Gil SY, Youn BS, Byun K, Huang H, Namkoong C, Jang PG, Lee JY, Jo YH, Kang GM, Kim HK, Shin MS, Pietrzik CU, Lee B, Kim YB, Kim MS.* Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway. Nat. Commun. 2013; 4, 1862.
9. *Huang Z, Cheng C, Jiang L, Yu Z, Cao F, Zhong J, Guo Z, Sun X.* Intraventricular apolipoprotein ApoJ infusion acts protectively in Traumatic Brain Injury. J. Neurochem. 2016; 136 (5), 1017-1025.
10. *Jarjanazi H, Savas S, Pabalan N, Dennis JW, Ozcelik H.* Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins. Proteins 2008; 70 (2), 394-403.
11. *Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. Nat. Genet. 2013; 45 (12), 1452-1458.
12. *May PC, Robison P, Fuson K, Smalstig B, Stephenson D, Clemens JA.* Sulfated glycoprotein-2 expression increases in rodent brain after transient global ischemia. Brain Res. Mol. Brain Res. 1992; 15 (1-2), 33-39.
13. *Nordestgaard LT, Tybjærg-Hansen A, Rasmussen KL, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R.* Genetic variation in clusterin and risk of dementia and ischemic vascular disease in the general population: Cohort studies and meta-analyses of 362,338 individuals. BMC Medicine 2018; 16 (1), 39.
14. *Pallardo-Fernández I, Iglesias V, Rodríguez-Rivera C, González-Martín C, Alguacil LF*. Clusterin as a potential biomarker of tobacco dependence / addiction. 3rd ENSP-CNPT International Conference on Tobacco Control. Tob. Prev. Cessation Suppl: 74. European Network for Smoking and Tobacco Prevention; 2018, p74.
15. *Park CH, Kim YS, Lee HK, Kim YH, Choi MY, Jung DE, Yoo JM, Kang SS, Choi WS, Cho GJ.* Citicoline reduces upregulated clusterin following kainic acid injection in the rat retina. Curr. Eye Res. 2007; 32 (12), 1055-1063.
16. *Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S.* Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. PLoS Genetics (2006); 2 (7), e100.
17. *Rodríguez-Rivera C, Pérez-García C, Muñoz-Rodríguez JR, Vicente-Rodríguez M, Polo F, Ford RM, Segura E, León A, Salas E, Sáenz-Mateos L, González-Martín C, Herradón G, Beato-Fernández L, Martín-Fernández J, Alguacil LF.* Proteomic identification of biomarkers associated with eating Control and bariatric surgery outcomes in patients with morbid obesity. World J. Surg. 2019; 43 (3), 744-750.
18. *Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD.* The addictive dimensionality of obesity. Biol. Psychiatry 2013; 73 (9), 811-818.

Rev. Toxicol (2020) 37: 6 - 10

Estudio farmacognóstico, antioxidante y citotóxico de Sinningia warmingii "papa madre"

Retuerto-Figueroa MG [*1ab], Ramos-Llica E[1ac], Gorriti-Gutiérrez AR[1ad], Gallardo-Jugo T[1ac], Ortega-Romero E[1ae], Calixto-Cotos M[2ae], Cosquillo-Rafael M[1ag], Fuertes-Ruitón C[3ad], Quispe-Jacobo F[1g], Villafuerte-Montes U[4h]

[1] Grupo de Investigación de Farmacognosia y Medicina Tradicional "GRUPO FARMA", Universidad Nacional San Marcos (UNMSM). Lima, Perú.
[2] Grupo de Investigación de Alimentos Nativos, Recursos Nativos y Metabolismo oxidative. Universidad Nacional San Marcos (UNMSM). Lima, Perú.
[3] Grupo de Investigación de Natural Resources Research (Nature)
[4] Grupo de Investigación de Caracterización Integral y Procesos Tecnológicos de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos. CIPTECAL
[a] Químico Farmacéutico b Magister en Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible
[c] Bachiller en Farmacia y Bioquímica d Doctor en Farmacia y Bioquímica
[e] Magíster en Productos Naturales y Biocomercio f Magister en Bioquímica
[g] Licenciado en Química h Ingeniero de Alimentos

Resumen: Los estudios farmacognósticos, antioxidantes y citotóxicos de plantas medicinales nativas de un país son la base para el desarrollo e innovación de productos herbarios con actividad biológica. *Sinningia warmingii*, planta herbácea peruana con raíces tuberosas se evaluó según sus características farmacognósticas, antioxidantes y citotóxicas. Los resultados muestran compuestos fenólicos, flavonoides y taninos como componentes mayoritarios, y trazas de alcaloides. La actividad antioxidante del extracto etanólico según DPPH mostró capacidades antioxidantes de 85,75 y 90,25% en las concentraciones de 16 y 20 µg/mL, respectivamente. La evaluación de citoxicidad sobre *Artemia salina* del extracto etanólico de *S. warmingii*, mostró una Concentración Letal media (CL50) de 591,40 µg/mL con una confiabilidad del 95%. Se concluye que el extracto etanólico de la raíz de *S. warmingii* presenta compuestos fenólicos con una significativa capacidad antioxidante, que es moderadamente tóxica de acuerdo con el CYTED.

Palabras clave: *Sinningia warmingii; Artemia salina;* análisis farmacognóstico; actividad antioxidante; citoxicidad.

Abstract: ***Pharmacognostic, antioxidant and cytotoxic study of Sinningia warmingii "papa madre"***

The pharmacognostic, antioxidant and cytotoxic study of medicinal native plants in a country is the base to develop and innovate herbal products with biological activity. In the present study, *Sinningia warmingii* has been studied according to pharmacognostic characteristics, antioxidant capacity by DPPH and cytotoxic properties on *Artemia salina*. The results have shown phenolic compounds, flavonoids, and tannins as majority components of ethanolic extract from *S. warmingii* roots. The antioxidant capacity of ethanolic extract evaluated by DPPH has shown 85.75 and 90.25% of antioxidant capacity in the concentrations of 16 and 20 µg/ml, respectively. The cytotoxic evaluation on *A. salina* from *S. warmingii* ethanolic extract has shown median lethal concentration (LC50) of 591.40 µg/ml. In conclusion, the ethanolic extract from *S. warmingii* roots have shown phenolic compounds with significant antioxidant capacity and moderately toxic according to CYTED.

Keywords: *Sinningia warmingii; Artemia salina*; pharmacognostic; Antioxidant activity; cytotoxic.

Introducción

La Sinningia warmingii (Gesneriaceae) denominada comúnmente "papa madre" con sinónimo científico *Reschsreineria peruviana* (Solomon 2012). Es una planta herbácea con raíces tuberosas, de tronco corto, hojas aterciopeladas verde oscuro, ovales, bordes crenulados, pecioladas y carnosas; flores provistas de amplia corola tubular, con cinco lóbulos púrpura-violáceo. Gesneriaceae es una familia de arbustos terrestres y epífitos que comprende entre 150 a 160 géneros y alrededor de 3 200 especies distribuidas en trópicos y subtrópicos del viejo y nuevo mundo (Kvist et al., 2005; Weber and Skog, 2007). *Sinningia* es un género neotropical y comprende 68 especies de hierbas (Chautems, 1990; Wang et al., 1990; Chautems at al., 2010). *Sinningia warmingii* (Hiern.) es una hierba con tubérculos perennes y brotes anuales, se distribuye ampliamente en Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Paraguay y Argentina (Kvist et al., 2005; Perret at al., 2006; Perret at al., 2007; Verdan et al., 2014). En el Perú, se encuentran 28 géneros y 150 especies de *Gesneraceae*, que son abundantes en los bosques húmedos (500-1000 msnm). En los departamentos de Lima, La Libertad y Lambayeque sólo se registra *Sinningia warmingii* (Diaz et al., 2012). Son numerosos los híbridos. *Sinningia warmingii* se encuentra en los departamentos de Cajamarca y Huancavelica, entre 2000 – 2500 m.s.n.m. (Mostacero et al., 2009). *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems está considerada en el catálogo de la flora de Contumazá-Cajamarca. En la provincia de Utcubamba, en el nororiente peruano, los pobladores de "Quebrada Seca Alta", conocen las propiedades de "papa madre", nombre popular con el que se describen a *S. warmingii* (Soukup, 1995; Sagástegui, 1995; Mostacero et al., 2009; Santa Cruz et al., 2019). Utilizada en el nororiente peruano para el alivio de ciertas dolencias de las mujeres, tratamientos de inflamaciones post-parto y flujos vaginales (Mostacero et al., 2009; Vicuña Z., 2011) se utiliza como infusión de sus tubérculos para el tratamiento de problemas ginecológicos, como inflamaciones puerperales y también se emplean en el tratamiento de vaginosis microbiana "descensos vaginales" (Diaz et al., 2012; Winiewski et al., 2017). En 98% de mujeres con vaginosis y hasta en un 50% en mujeres sanas, se ha clasificado a *Gardnerella vaginalis como* una sola especie, estableciéndose como agente causal de la vaginosis (Klouman et al., 2005).

Muchas de las propiedades preventivas o curativas, para hacer frente a enfermedades agudas y crónicas, se restringen a la naturaleza química de los fitoquímicos presentes en las especies vegetales y en particular a los compuestos polifenólicos, fitoquímicos (Mercado et al., 2013).

Las plantas presentan principios activos con notable actividad fisiológica en el ser humano, siendo un importante aliado para la prevención y tratamiento de ciertas patologías. No obstante, pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan; por esta razón, se realizan investigaciones para determinar la presencia de metabolitos secundarios con bioactividad y toxicidad de las plantas medicinales (Cruz et al, 2013).

Los beneficios potenciales de los antioxidantes están principalmente asociados a los efectos supresores sobre los radicales libres (Vallejo et al., 2017; Zheng and Anggreani, 2017). La capacidad antioxidante evaluada *in vitro* puede usarse como un indicador indirecto de la actividad *in vivo.* La determinación de la capacidad antioxidante de extractos, se realizó mediante e ensayo DPPH (Arnao et al., 2011). La capacidad antioxidante está relacionada con los diferentes tipos de solventes de extracción de sus constituyentes químicos bioactivos, que proporcionan respuestas diferentes. Además, el tiempo de

*e-mail: monica.retuerto@unmsm.edu.pe

almacenamiento parece interferir en la estabilidad de estas sustancias (Santos and Goncalves; 2016).

La *Artemia salina* (Crustacea: Artemiidae) "camarón salino" o "camarón de salmuera" es un crustáceo utilizado para evaluar compuestos con actividad biológica y con estructuras químicas variadas (Naidu et al., 2014; Iannacone et al., 2016). El microcrustáceo se emplea como alimento vivo para peces y crustáceos marinos en cultivo por su alto valor nutricional (Ramírez et al., 2010; Nishimori et al., 2016), considerada una herramienta inicial para evaluar la toxicidad de toxinas fúngicas, extractos de plantas, metales pesados (Iannacone et al., 2016).

El objetivo del presente estudio fue determinar la caracterización farmacognóstica, antioxidante y citotóxica de *Sinningia warmingii*.

El conocimiento de los constituyentes químicos, la capacidad antioxidante y citotóxica de *Sinningia warmingii*, permitirá determinar la concentración óptima para estudios posteriores que tengan como objetivo aislar el o los constituyentes químicos para elaborar formulaciones farmacéuticas y evaluación de posibles efectos secundarios adversos.

Materiales y métodos

Muestra: 10 kg de raíces tuberosas de *Sinningia warmingii* se colectaron al azar en la etapa de floración en la provincia de Utcubamba-Amazonas, situada a 400 m.s.n.m. La identificación taxonómica de la especie vegetal se realizó con un ejemplar completo en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Reactivos: etanol absoluto QP, metanol QP, agua bidestilada, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8 tetrametilcromo-2 ácido carboxílico 97%) (Sigma-Aldrich USA), vitamina C (Sigma-Aldrich, USA) y reactivos necesarios para el tamizaje fitoquímico.

Equipos: espectrofotómetro UV-visible (Merck), balanza analítica de capacidad de 1 mg - 200 g (Ohaus Pioneer), Estufa (Memmert).

Preparación del extracto

La raíz de la muestra se procedió a limpiar, secar y licuar con etanol; se llevó a maceración por 7 días y posteriormente se desecó en estufa de aire circulante a una temperatura de 40ºC por 2 días.

Tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina

Con el uso de reactivos de coloración y precipitación se determinó los constituyentes químicos del extracto etanólico (Lock De Ugaz, 2016).

Capacidad antioxidante

El método del reactivo 2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo (DPPH) desarrollado por Brand-Willams et al. (1995) se utilizó para evaluar la capacidad antioxidante. El método ofrece una detección rápida de la capacidad de eliminación de radicales de compuestos específicos (Gülcin I., 2012). El radical DPPH tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción con sustancias antioxidantes, el cambió se mide en el espectrofotómetro UV-Vis (GENESYSTM 10S UV-Vis, ThermoFisher Scientific) a la longitud de onda de 517 nm (Ramos et al., 2008; Arnao et al., 2011;) y los resultados se expresan como concentración inhibitoria al 50% de su capacidad (IC_{50}).

Determinación de la actividad citotóxica.

Ensayo biológico de letalidad de *Artemia salina* (Martínez-Hormaza et al., 2006; Haule et al., 2012; Abdul et al., 2016; Rahman et al., 2016;) "camarón de salmuera" fue realizado para ver el efecto citotóxico del extracto de la raíz de *Sinningia warmingii* sobre nauplios de camarones en salmuera. Los huevos de salmuera de camarones de *Artemia salina* fueron donados por IMARPE (Instituto del Mar del Perú). Se procedió a preparar las condiciones para la eclosión de los huevos (Fig. 1), Los huevos de *Artemia salina* se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (25–30 ° C) en agua salina preparada con sal marina, para la eclosión de los nauplios, y ser trasvasados a los viales. Para la prueba de control cada vial contenía 10 mL de agua de mar y 10 nauplios vivos. Cada experimento se realizó en tres réplicas. Las gambas supervivientes fueron contadas después de 24 horas (figura 2).

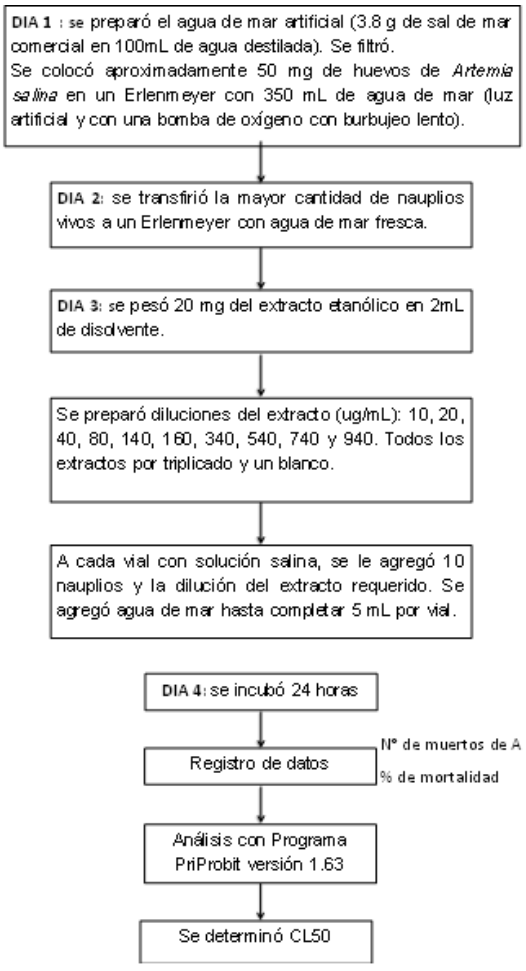


Figura 2: Método de *Artemia salina*

Tratamiento de datos

La capacidad antioxidante fue determinada por el método de regresión utilizando el programa de Excel ver. 2016.

Los datos obtenidos de la actividad citotóxica fueron procesados usando un programa estadístico PriProbit, versión 1.63. Se determinó el porcentaje de mortalidad y la citoxicidad del extracto.

Resultados

Estudio farmacognóstico

El estudio cualitativo determinó compuestos fenólicos: heterósidos flavónicos y taninos, constituyentes mayoritarios y trazas de alcaloides (tabla 1).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es dependiente de la concentración del extracto, se determinó una elevada capacidad captadora de radicales libres a concentraciones de 16 y 20 µg/mL, fue de 85,75 y 90,25% respectivamente; presentando una Concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 10,39 µg/mL. (tabla 2, figura 1).

Tabla 1. *Screening farmacognóstico de raíz Sinningia warmingii "papa madre"*

N°	Reactivo	Extracto etanólico	Constituyentes químicos
1	Molish	+	carbohidratos
2	Felhing	+	Azucares reductores
3	Trommer	+	Azucares reductores
4	$FeCl_3$	+	Compuestos fenólicos
5	Gelatina	+	Taninos
6	Agua de bromo	+	Taninos catéquicos
7	Shinoda	+	Flavonoides
8	Borntrager	-	Compuestos antraquinónicos
9	Lieberman-Burchardat	-	Compuestos triterpenoides
10	Ninhidrina	-	Compuestos amino
11	Dragendorff	+	Alcaloides
12	Mayer	-	Alcaloides
13	Bertrand	-	Alcaloides
14	Sonnenschein	+	Alcaloides
15	Popofff	+	Alcaloides
16	Prueba de espuma	-	Saponinas

+: presencia; -: ausencia

Tabla 2. *IC_{50} (µg/mL). Concentración inhibitoria media necesario para reducir al 50% la concentración inicial del radical DPPH por el extracto etanólico de raiz Sinningia warmingii "papa madre"*

Concentración µg/mL	Tubo 1 Abs.	Tubo 2 Abs.	Tubo 3 Abs.	PROMEDIO Abs.	Cap. Antiox %	IC 50 (µg/mL)
20	0.049	0.048	0.044	0.047	90.25	
16	0.063	0.065	0.078	0.069	85.75	
12	0.198	0.199	0.199	0.199	58.82	10.39 ± 0,003
8	0.306	0.298	0.299	0.301	37.55	
4	0.390	0.392	0.385	0.389	19.29	

Valores (DS ± medio, n=3)

Actividad citotóxica y determinación de Concentración Letal Media (CL_{50}) .

El extracto etanólico de la raíz de *Sinningia warmingii* mostró letalidad moderada. La tasa de mortalidad del camarón de salmuera se incrementó de acuerdo con el aumento de la concentración de la raíz (tabla 4).

La letalidad se calculó a partir de la supervivencia media de nauplios en viales tratados con extracto y solución control. En la evaluación de la citoxicidad en Artemia salina del extracto etanólico de *Sinningia warmingii*, se determinó con la Concentración Letal Media (CL_{50}), 591,40 µg/mL (450,25 µg/mL y 830,59 µg/mL) con una confiabilidad al 95%.

Discusión

El estudio farmacognóstico del extracto de la raíz *Sinningia warmingii* determinó presencia de azúcares, compuestos fenólicos en alta cantidad y alcaloides en menor proporción, mientras en los estudios de tubérculos de *Sinningia warmingii* de Brasil (Verdan et al., 2014) difiere de los constituyentes químicos encontrados en la fracción de hexano del extracto etanólico: ocho compuestos identificados como 7-hidroxi-α-dunniona, lapachenol, tectoquinona, 7-metoxitectoquinona, 1-hidroxitectoquinona, 7-hidroxitectoquinona, agregatina C, agregatina D, halleridone, y cedrol. Asimismo, aislaron una mezcla de esteroides, sitosterol y

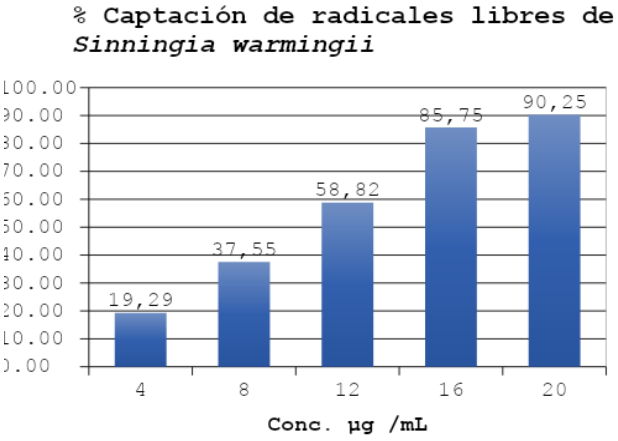


Figura 1: Capacidad antioxidante del extracto etanólico de raíz de *Sinningia warmingii* "papa madre"

Tabla 4. *Citotoxicidad. Efecto del extracto de raíz de Sinningia warmingii "papa madre" sobre nauplios de Artemia salina*

Concentración (µg/mL)	Log (C)	% mortalidad	CL_{50} (µg/mL)
10	1	0	
20	1.3	0	
40	1.6	0	
80	1.9	0	591,40
140	2.1	0	
160	2.2	0	(450,25 - 830,59)
340	2.5	30	
540	2.7	50	
740	2.9	60	
940	3	70	

estigmasterol. Las diferencias podrían deberse a las diferencias edafológicas y al fraccionamiento realizado en hexano.

Los resultados de investigaciones de Verdan et al., 2013; son similares a los obtenidos en nuestra investigación con respecto a los compuestos fenólicos, pero hay que tener en cuenta que los estudios farmacognósticos se realizaron sobre una especie diferente de *Sinningia Leucotricha* encontrando flavonoides, esteroides, fenilpropanoides, quinonas, cromenos, etilciclohexanos y aceites esenciales.

Se determinó una elevada capacidad captadora de radicales libres a concentraciones de 16 y 20 µg/mL, su capacidad antioxidante fue de 85,75 y 90,25% respectivamente. Con nuestros resultados podemos inferir que la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos podrían brindar efecto antiinflamatorio; siendo ensayos preliminares, recomendamos más estudios que permitan validar el uso tradicional de esta especie.

El método de *Artemia salina* para evaluar la toxicidad del extracto nos proporciona información inicial y preliminar de toxicidad y es un indicador de bioactividad, antes de probar un compuesto en líneas celulares (Pino et al., 2010). Los extractos acuosos presentan un riesgo de toxicidad cuando muestran valores $CL_{50} \leq 1$ mg / mL. (Gastaldi et al., 201). Asimismo, teniendo en cuenta la clasificación de toxicidad, todas coinciden en agrupar las sustancias con CL_{50} inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 µg/mL se clasifican como no tóxicos (Martinez et al., 2006; Hernandez et al., 2017). Este método tiene las ventajas de ser rápido, bajo costo,

sencillo, reproducible y aceptado por la comunidad científica para evaluar la citotoxicidad de especies vegetales (Pérez at al., 2010). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras. Asimismo, los defensores de los derechos de los animales no han objetado el uso de estos invertebrados para el trabajo experimental (Jacques et al., 2004).

Martínez-Hormaza et al. trabajaron con muestras de hojas de *Erythroxylum confusum* Britt, donde el valor promedio de la CL_{50} fue por debajo de 640 µg/mL, por lo que consideraron a todas las muestras como no tóxicas. En nuestro estudio los valores son similares por lo que se considera a la *Sinningia warmingii* como no tóxica y de acuerdo al CYTED (tabla 3), como ligeramente tóxica, lo que valida su bioactividad.

Tabla 3. *Clasificación de toxicidad según CYTED*

	Toxicidad	µg/mL
1	Extremadamente tóxico	0-10
2	Altamente tóxico	10-100
3	Moderadamente tóxico	100-500
4	Ligeramente tóxico	500-1000
5	Prácticamente no tóxico	1000-1500
6	Relativamente inocuo	<1500

Conclusiones

El estudio farmacognóstico determinó presencia de carbohidratos y compuestos fenólicos como constituyentes mayoritarios, evidenció capacidad antioxidante y presenta actividad citotóxica en *Artemia salina*.

Agradecimientos

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Proyecto CON CON Código: 140401071, RR N°01243-R-14)

Bibliografía

1. *Abdul-Awal S, Nazmir S, Nasrin S, Rahman T. and Jamal S.* Evaluation of pharmacological activity of *Hibiscus tiliaceus. SpringerPlus (2016) 5:*1209. DOI 10.1186/s40064-016-2891-0
2. *Arnao I, Seminario J, Cisneros R. y Trabucco J*. Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacón, Smallanthus sonchifolius (Poepp. &Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca–Perú. An Fac med. 2011; 72 (4):239-43.
3. *Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol. 1995; 20: 25-30.
4. *Chautems, Alain.* Taxonomic Revision of Sinningia NEES: nomenclaturalchanges and new synonymies - (1990a). Candollea 45 / 1, pp. 381-388
5. *Chautems A, Costa T, Peixoto M. & Rossini J.* Taxonomic revision of Sinningia Nees (Gesneriaceae) IV: six new species from Brazil and a long overlooked taxón. *Candollea* 65(2): 241-266 (2010).
6. *Cruz C. and Morocho L*. Determinación de la concentración letal media en *Artemia salina* de diez extractos hidroetanólicos de especies de plantas de *Zamora chinchipe*. *Centro de Biotecnología, vol. 2* nro. 1. 2013
7. *Diaz C, Bautista P, Bautista K, Jurado B, Placencia M. y Chimoy P*.Análisis fitoquímico preliminar de la papa madre (*Sinningia warmingii*). Pueblo cont. 23(2) 2012.
8. *Gülcin, I.* (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. Arch Toxicol (2012) 86:345–391
9. *Haule E, Moshi M, Nondo R, Mwangomo D. and Mahunnah R. A* study of antimicrobial activity, acute toxicity and cytoprotective effect of a polyherbal extract in a rat ethanol-HCl gastric ulcer model. BMC Research Notes 2012, 5:546
10. *Hernández E, Carrazana D, González R, García A, Marrero O, Águila E, Morales A. y López Y*. Ecotoxicidad aguda en Physa cubensis P. y Artemia salina L. de 8 antibacterianos con riesgo ambiental. *Rev. Toxicol* (2017) *34:* 118- 123
11. *Iannacone J, Alvariño L, Valle V, Ymaña B, Argota G, Fimia F, Carhuapoma M. and Castañeda L.* Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). Rev. Toxicol (2016) 33: 31-38
12. *Jacques E, Massayoshi S, Martin A, Mascarenhas A, da Silva A, Nicácia C, et al.* Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. *Pharmaceutical Biology*. 2004; *42* (3): 253-257.
13. *Klouman E, Manongi R and Klepp K*. Self-reported and observed female genital cutting in rural Tanzania: associated demographic factors, HIV and sexually transmitted infections. *Trop Med Int Health.* 2005 *Jan; 10*(1):105-15.
14. *Kvist L, Skog L, Amaya-Márquez M, Salinas I.* Las Gesneriáceas de Perú. Arnaldoa. 2005. 12 (1-2):16-40.
15. *Lock De Ugaz O*. (2016). Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales.Lima, Perú. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
16. *Martínez-Hormaza I, Quintero-Rodríguez G, Márquez-Montiel L, González-Lavaut J, Álvarez-Reyes A. & Zarragoitía A*. Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el Método de la *Artemia salina*. *Acta Farm. Bonaerense* **25** (3): 429-31(2006)
17. *Martínez H, Carrazana D, González R, García A, Marrero O, Águila E, Morales A. y López Y.* Ecotoxicidad aguda en Physa cubensis P. y Artemia salina L. de 8 antibacterianos con riesgo ambiental. *Rev. Toxicol* (2017) *34*: 118- 123
18. *Mercado-Mercado G, De la Rosa L, Wall-Medrano A, López J. y Álvarez-Parrilla E*. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. Nutr Hosp. 20t3;28 (l):36-46
19. *Mostacero J., Mejía F., Gamarra O.* Fanerógamas del Perú: Taxonomía, utilidad y ecogeografía. Edit. CONCYTEC. Pag. 833. Trujillo, 2009
20. *Naidu J, Ismail R. and Sasidharan S.* Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae). *Trop J Pharm Res, January 2014;* 13(1): 101.
21. *Nishimori T, Miura K. and Seko t.* Rearing *Orius strigicollis* (Hemiptera: Anthocoridae) on an alternative diet of brine shrimp, *Artemia salina* (Anostraca: Artemiidae). *Appl Entomol Zool* (2016) *51*:321–325
22. *Pérez P, Lazo F.* Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Rev. Protección Veg. [revista en la Internet]. 2010 Abr [citado 2015 Jul 25]; 25(1): 34-43. Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script = sci_arttext&pid = S1010- 27522010000100008&lng=es.
23. *Perret M, Chautems A, Spichiger R.* Dispersal-vicariance analyses in the tribe Sinningieae (Gesneriaceae): a clue to understanding biogeographical history of the Brazilian Atlantic forest. Ann. MO Bot. Gard, 2006. 93:340–358.
24. *Perret M, Chautems A, Spichiger R, Barraclough Tg, Savolainen*

V. 2007. The geographical pattern of speciation and floral diversification in the neotropics: the tribe sinningieae (gesneriaceae) as a case study. JournalThe Society for the Study of Evolution. Evolution 61-7: 1641-1660.

25. *Pinzón R, Sánchez C*. Manual de Técnicas de Investigación: CYTED. Subprograma X. Química fina farmacéutica 1995, 45-47

26. *Pino Pérez Oriela, Jorge Lazo Fanny.* ENSAYO DE ARTEMIA: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES. Rev. Protección Veg. [Internet]. 2010 Abr [citado 2019 Jun 23]; 25(1): 34-43. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000100008&lng=es.)

27. *Rahman A, Siddikey A, Uzzal M, Islam R. and Emran A.* A preliminary evaluation of cytotoxicity, antihyperglycemic and antinociceptive activity of *Polygonum hydropiper* L. ethanolic leaf extract. Oany et al. Clinical Phytoscience (2016) 2:2

28. *Ramírez-Merlano J, Otero-Paternina A, Corredor-Santamaría W, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. y Velasco-Santamaría y.* Utilización de organismos vivos como primera alimentación de larvas de yaque (*Leiarius marmoratus*) bajo condiciones de laboratorio. *Revista ORINOQUIA - Universidad de los Llanos - Volumen 14* - No 1 - Año 2010

29. *Ramos E, Castañeda B, Ibáñez L*. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. REV ACAD PERU SALUD 15(1), 2008

30. *Santa Cruz L. et al.*, Inventario de la flora de angiospermas del distrito Pulán, provincia Santa Cruz, Cajamarca, Perú. *Arnaldoa* 26 (1): 139-212, 2019 http://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26108

31. *Santos M. & Goncalves E.* Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. Scientia Agropecuaria 7 (1) 7 – 14 (2016)

32. *Sagástegui A.* Diversidad Florística de Contumazá. Fondo Editorial Universidad Orrego de Trujillo. 1ª.ed.Trujillo 1995

33. *Soukup J.* Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Edit. Salesiana. 2ª. ed. Pag. 378, 1980

34. *Solomon J.* 2012. W3 TROPICOS - Base de Datos del Missouri Botanical Garden Herbarium (MO) [MBG, http://www.tropicos.org/].

35. *Vallejo-Zamudio E, Rojas-Velázquez A, Torres-Bugarín O.* Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes. www.medigraphic.com/elresidente. Septiembre-Diciembre 2017 / Volumen 12, Número 3. p. 104-111

36. *Verdan M, Unemoto L, Faria R, Salvador M, Lemos de Sá L, Barison A, Stefanello A.* Leucotrichoic acid, a novel sesquiterpene from Sinningia leucotricha (Gesneriaceae). Tetrahedron Letters 54 (2013) 4735–4737

37. *Verdan M, Ehrenfried C, Riva d, Cervi A, Salvador C, Barison A. and Stefanello M*. Chemical Constituents from *Sinningia canescens* and *S. warmingii*. Natural Product Communications Vol. 9 (10) 2014

38. *Vicuña Z.* Inventario de plantas medicinales del Tahuantinsuyo. Tomo II Pag. 1015. Lima, 2011.

39. *Wang W, Pan K, Li Z.* Gesneriaceae. In: Wang Wentsai, ed., Fl. Reipubl. Popularis Sin. 69: 125-581. 1990.

40. *Weber A, Skog L E*. .The genera of Gesneriaceae. Basic informationwithillustration of selectedspecies. 2007 Ed 2 http//:www.generagesneriaceae.at.

41. Winiewski V, Verdan M, Ribeiro M, Hernandez-Tasco A, Salvador N. and Stefanello M.

42. Warmingiins A and B, Two New Dimeric Naphthoquinone Derivatives from *Sinningia warmingii* (Gesneriaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 28, No. 4, 598-602, 2017.

43. *Zheng X, Hu Y, Anggreani E, Lu X.* Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of blueberries using Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy and Raman spectroscopy. Food Measure (2017) 11:1909–1918 DOI 10.1007/s11694-017-9573-7

Efecto Genotóxico del material particulado PM2.5 recolectado en la zona urbana de Cuenca - Ecuador sobre la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1

Narváez M[1], Astudillo A , García N [†], Moscoso D[1], Mejía D[1], Vásquez P[1], Maza D[2], Bailón N[3].*

[1] Centro de Estudios Ambientales, Universidad de Cuenca (CEA), Cuenca-Ecuador.
[2] Departamento de Química y Ciencias Exactas, Sección de Ingeniería Ambiental de la Universidad Técnica Particular de Loja_Ecuador.
[3] Departamento de Ciencias de la Salud, Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja_Ecuador.

Resumen: Estudios toxicológicos y epidemiológicos ponen de manifiesto que el material particulado (PM) específicamente el $PM_{2.5}$ tiene efectos negativos significativos en la salud humana, asociado con mortalidad, insuficiencia cardíaca, trastornos respiratorios, enfermedades pulmonares y cáncer. La toxicidad y el efecto inflamatorio de estas partículas están relacionados con su tamaño y características químicas. En este estudio se determinaron las características químicas de las fracciones acuosas y orgánicas solubles del $PM_{2.5}$ recolectado en tres sitios de monitoreo del área urbana de la ciudad de Cuenca-Ecuador y se evaluó su actividad genotóxica mediante el ensayo del cometa en la línea celular de ovario de hámster chino, CHO-K1. El análisis gravimétrico de las muestras reveló que dos de los sitios de estudio superaron el límite de 25 µg/m^3 establecido por la Organización Mundial de la Salud. En la caracterización de las fracciones acuosas y orgánicas se determinó la presencia de metales como el hierro y zinc e hidrocarburos aromáticos tales como el benzo(a) antraceno respectivamente. Las células fueron expuestas a 3,26 m^3 de aire /mL de los extractos acuosos y 1,63 m^3 de aire/mL de los extractos orgánicos. Finalmente se observó que los extractos obtenidos de $PM_{2.5}$ inducen daño genotóxico en la longitud del largo de cola medido mediante el ensayo del cometa; este tipo de daño pueden atribuirse a la combinación de las especies químicas detectadas.

Palabras claves: Material particulado; genotoxicidad; ensayo del cometa; metales pesados; hidrocarburos aromáticos; $PM_{2.5}$.

Abstract: ***Genotoxic effect of $PM_{2.5}$ particulate material collected in the urban area of the city of Cuenca - Ecuador in the Chinese hamster ovary cells line CHO-K1*.**

Toxicological and epidemiological studies have a manifesto that particulate matter (PM), specifically $PM_{2.5}$ has negative effects on human health, associated with mortality, heart failure, respiratory disorders, lung diseases, and cancer. The toxicity and inflammatory effect of these particles are related to their size and chemical characteristics. The objective of this study was to determine the characteristics of the soluble aqueous and organic fractions of the particulate material $PM_{2.5}$ collected in the monitoring sites of the urban area of the city of Cuenca-Ecuador and to evaluate its genotoxic activity by means of the test of the comet of in the Chinese hamster ovary cells line CHO-K1. The gravimetric analysis of the samples revealed that two of the study sites exceeded the limit of 25 ug / m^3 established by the WHO. In the characterization of water and organic fractions, the presence of metals such as Fe and Zn and aromatic hydrocarbons such as benzo(a) anthracene determined, respectively. Cells were exposed to 3,26 m^3 of air /mL of aqueous extracts and 1,63 m^3 of air/ mL of organic extracts. Finally, it was observed that the extracts obtained from $PM_{2.5}$ induce genotoxic in the length of tail length measured by the comet assay; this type of damage can be attributed to the combination of the detected chemical species.

Keywords: Particulate matter; genotoxicity; comet assay; heavy metals; aromatic hydrocarbons

Introducción

El desarrollo industrial y el crecimiento urbano asociados a las emisiones de una variedad de fuentes, incluyendo la combustión de gasolina y diésel así como las industriales, ha traído como consecuencia el deterioro del ambiente, afectando la calidad del aire (Lacasaña et al., 1999; Vasconcellos et al., 2007). Entre los distintos contaminantes del aire, el material particulado (PM) constituye uno de los más importantes por sus efectos asociados con la química de los procesos atmosféricos, el clima (Sienra et al., 2002; Vasconcellos et al., 2007), y la salud, (Pope III et al., 2002; Valavanidis et al., 2008) induciendo en algunos casos enfermedades cardiovasculares (Shah et al., 2013), respiratorias (Porredon et al., 2014), y trastornos neurodegenerativos. El PM está formado por una mezcla de partículas finas y ultrafinas, presentado mayor interés las partículas $PM_{2.5}$ ya que pueden ingresar en los pulmones, que por su gran superficie de contacto, pueden absorber diversas sustancias de conocida actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA) (Abou et al.,2007; Bełcik et al., 2018; Gutiérrez et al., 2006), especies aniónicas y catiónicas, (Astudillo et al., 2015), las cuales asociadas a las partículas atmosféricas inducen estrés oxidativo en las células, las mismas que inician con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), capaces de inducir cambios en ciclo redox celular y por tanto desencadenar una serie de eventos en cascada como la apoptosis, inflamación y daño oxidativo a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Actualmente, por convención internacional se encuentran reguladas y consideradas como contaminantes críticos, las partículas en suspensión de PM_{10} ($\leq$ 10 µm) y $PM_{2.5}$ ($\leq$ 2.5 µm), por su presunta contribución en la mortalidad y morbilidad por afecciones a largo plazo como el decremento en la función pulmonar y la aparición de cáncer (Sahagún, 2009). La presente investigación tiene por objetivo caracterizar químicamente las fracciones acuosas y orgánicas solubles del material particulado $PM_{2.5}$; y evaluar sobre la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1), el posible efecto genotóxico mediante el ensayo del cometa, el cual es un método rápido, sensible y económico. Dicho análisis pone de manifiesto la hipótesis de que los metales pesados e hidrocarburos aromáticos presentes en los extractos solubles de $PM_{2.5}$ estarían relacionados con los daños genotóxicos ocasionados en las células tras 24 horas (h) de exposición.

Metodología

Selección de sitios de estudio

La selección de los puntos de monitoreo se realizó en función de un estudio preliminar, ejecutado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, cuyo objetivo fue determinar las áreas con mayores concentraciones de material particulado. Se seleccionaron tres puntos que se consideraron significativos recogidos en la Figura 1 y cuyas coordenadas geográficas son: punto P1 (2°53'37,63"S 79° 0'13,92"O) localizado en el centro histórico de la ciudad, el cual se caracteriza por presentar altas emisiones vehiculares y poca vegetación; punto P2 (2°53'7,86"S 79° 0'33,23"O) localizado al oeste de la ciudad, este sector está designado de acuerdo a la ordenanza de uso de suelo como vivienda y el punto P3 (2°54'48,19"S 79° 2'14,08"O), asignado de acuerdo a la ordenanza como uso principal vivienda. (Figura 1).

Recolección de las muestras y determinación de las concentraciones

Se empleó un equipo de bajo caudal (Partisol 2000i), con un flujo de 16,3 L de aire/min. Se utilizaron filtros de fibra de teflón de 47 mm de diámetro y 2 µm de poro. Los filtros fueron expuestos a 24 h de monitoreo (Legal Information Institute, 1992). La concentración de las partículas fue determinada por análisis gravimétrico, previa

*e-mail: *monica.narvaez@ucuenca.edu.ec*

estabilización de los filtros (40 % - 45 %) de humedad relativa y temperatura (entre 15 ºC y 30 ºC), pesados antes y después de la recolección. Las concentraciones fueron corregidas de acuerdo a lo establecido en la normativa nacional ecuatoriana en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio de Ambiente (Lexis Finder, 2015).

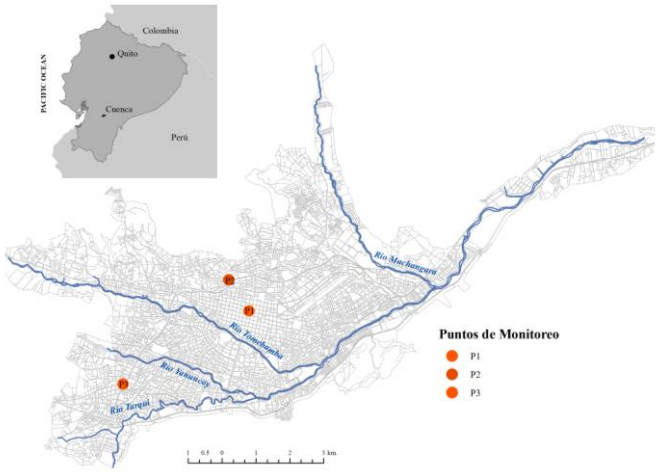


Figura 1: Mapa de las zonas de monitoreo de material particulado PM $_{2,5}$

Obtención del extracto acuoso soluble de material particulado y su caracterización

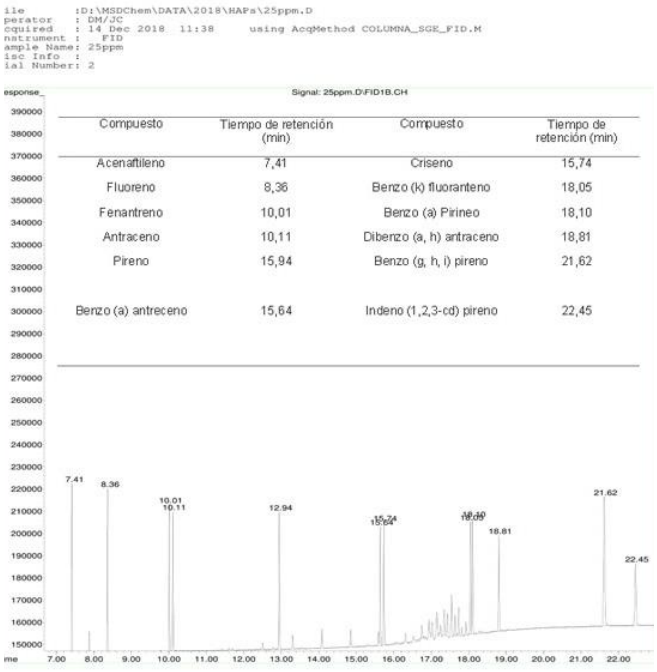
Las partículas contenidas en los filtros fueron extraídas con agua ultra pura, empleando un equipo de ultrasonido modelo Cole- Parmer 8894, durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente el extracto fue centrifugado a 2500 g durante 30 min para sedimentar la materia insoluble. Las soluciones frescas preparadas fueron almacenadas a 4 ºC, para su posterior empleo en el ensayo de genotoxicidad. Para el análisis de los metales pesados Fe, Al, Ni, Pb, Cu; en los extractos acuosos se empleó el método analítico NIOSH 7082 por espectroscopia de absorción atómica, empleando el equipo de marca Perkin Elmer AA400.(The Perkin-Elmer Corporation, 1996)

Obtención del extracto orgánico soluble de material particulado y su caracterización

Para los extractos orgánicos los filtros fueron sonicados con 10 mL de una mezcla diclorometano-acetona **(50% - 50%)** durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio a 10 mL, y fueron centrifugados a 2500 g durante 30 min, el sobrenadante fue evaporado a sequedad y posteriormente resuspendido en 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), las muestras fueron almacenadas a 4 ºC, para su posterior empleo en el ensayo de genotoxicidad. Para la caracterización de los extractos orgánicos, [benzo (b) fluoranteno], [benzo(a) pireno], [benzo(a) antraceno], y [fenantreno], se aplicó el método adaptado de referencia EPA 610 PAH (Environmental Protectión Agency, 1984). La cuantificación se realizó mediante un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N en detector FID (Flame Ionization Detector) y se utilizó una columna ID-BPX5 de 50 m de longitud, 0,22 mm de diámetro y de 0,25 µm de porosidad. Para la cuantificación de los HAPs se utilizó el estándar de 13 hidrocarburos de Sigma-Aldrich (catálogo# 48953-U EPA 525 PAH MIX-A, 1X1 ML, 500 mg). El análisis CG-FID se realizó en las siguientes condiciones de operación: detector FID a 250 °C mezcla (ml/min): Aire 300 – H_2 30 – N_2 45. Se inyectó 1 µl en modo splitless a 250 °C. La temperatura inicial fue 45 °C por 1 min y se incrementó de la siguiente manera 25 °C/min hasta llegar a 200 °C, 8 °C/min hasta 280 °C, 10 °C/min hasta 330 °C durante 5 min. El tiempo de análisis es de 25 min. El gas de arrastre empleado fue He con un flujo de 1,8 mL/min. La temperatura de inyección fue 250 °C. (Figura 2).

Modelo Biológico

Para los ensayos biológicos se empleó células CHO-K1 que fue cultivada en medio base HAMF-12 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), L-glutamina (2 mM, GIBCO



Compuesto	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Tiempo de retención (min)
Acenaftileno	7,41	Criseno	15,74
Fluoreno	8,36	Benzo (k) fluoranteno	18,05
Fenantreno	10,01	Benzo (a) Pirineo	18,10
Antraceno	10,11	Dibenzo (a, h) antraceno	18,81
Pireno	15,94	Benzo (g, h, i) pireno	21,62
Benzo (a) antreceno	15,64	Indeno (1,2,3-cd) pireno	22,45

Figura 2: Cromatograma y picos registrados para los compuestos orgánicos

Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y antibiótico-antimicótico (100 unidades/ml de Penicilina G, 100 µg/mL de Estreptomicina y 25 µg/mL de Amfotericina B, GIBCO Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). El cultivo celular se mantuvo en incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda con el 5 % de CO_2, con un tiempo de duplicación de 24 h. Las células fueron expuestas a distintas concentraciones (0,82 m^3 de aire/mL, 1,63 m^3 de aire /mL y 3,23 m^3 de aire /mL) tanto de extractos acuosos como de los extractos orgánicos. Como control positivo, se usó el doxorrubicina 2 µM. Además, se trabajó como control negativo de células en agua destilada, y los blancos de cultivo celular con soluciones acuosas y orgánicas de filtros libres de partículas.

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos, con un total de 3,5 x 10^3 células por pocillo, se incubó por 24 h, transcurrido este tiempo se adicionó el tratamiento respectivo por 24 h de exposición.

Ensayo de citotoxicidad por FDA/BrEt

Tras 24 h de exposición se realizó el ensayo de viabilidad según el protocolo descrito por Jones y Senft (Jones, 1985), con ligeras modificaciones. A la suspensión celular se adicionó una solución de diacetato de fluoresceína (5 mg/mL) – bromuro de etidio (0,2 mg/mL). Se contabilizaron 200 células por placa cada una por duplicado y se analizó en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus).

Determinación de daño genotóxico mediante ensayo del cometa in vitro en células CHO-K1

El protocolo para el ensayo cometa se fundamentó en el descrito por (Olive y Banáth, 2006) adaptado a las condiciones del laboratorio. Transcurrido el tiempo de exposición, las células fueron tripsinizadas y lavadas con medio suplementado, dos veces consecutivas. Las células se suspendieron con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión 1 % (LMP) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 37 ºC y fueron colocadas sobre un portaobjetos que contenía una capa de agarosa. Se añadió una tercera capa de agarosa LMP. Las placas fueron colocadas

en una solución de lisis [10 % de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1 % Tritón X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2,5M NaCl (Merck), 100 mM EDTA (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA), 10 mM Tris (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) y pH 10] por 24 h. Desde este paso en adelante se trabajó en oscuridad, a 4 ºC. Posteriormente, las placas se dejaron reposar en un buffer de electroforesis [300 mM NaOH (Merck Germany), 1mM EDTA, pH>13], por un período de 20 min. La electroforesis se efectuó en condiciones de 25 voltios, 300 mili-Amperios durante 20 min. Después de este tiempo, las placas se colocaron en una solución de neutralización (pH 7,5), y deshidratadas con metanol para su análisis posterior.

Para el análisis, se tiñeron con 60 µL de bromuro de etidio (1,5 µg/mL). En el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus), se analizaron 100 células, en cada placa, mediante el uso del software Comet Assay IV, que permiten obtener parámetros de medición de la migración del ADN, donde se evaluaron dos parámetros, la longitud de la cola del cometa medida desde el centro del núcleo hacia el final de la cola. El otro parámetro fue el porcentaje de ADN en la cola dado por 100 multiplicado por la intensidad del ADN en cola con respecto a la intesidad del ADN en la célula.

El análisis estadístico para los ensayos de viabilidad y efectos genotóxicos se realizó mediante el análisis estadístico de varianza (ANOVA), seguido del test Dunnet. En el caso del ensayo genotóxico se aplicó el estadígrafo de Kruskal-Wallis usando el programa GraphPad Prism 8.0.

Resultados

Concentraciones de $PM_{2.5}$

El análisis de las concentraciones de $PM_{2.5}$ muestra valores similares en los puntos P1 y P3. El punto P2 presenta una concentración significativamente menor en comparación a los otros sitios de estudio ($p < 0,001$) (Tabla 1).

Tabla 1. *Concentración promedio de 22 muestras de material particulado $PM_{2.5}$ recolectado durante un período de 24 h continuas, con intervalos de tres días, en cada sitio de estudio.*

Sitios de estudio	Concentración mínima (µg/m^3)**	Concentración máxima (µg/m^3)**	Concentración promedio (µg/m^3)** ±DS
P1	16,09	59,56	29,81*±11,44
P2	5,44	38,52	19,93 ±10,25
P3	16,20	60,14	37,31*±14,02

El monitoreo se realizó de acuerdo a los estipulado en la normativa Nacional Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del ministerio del Ambiente, Libro VI, Anexo IV, el equipo empleado para la recolección de las muestras fue el Partisol 2000i. (*) Concentraciones que superan la normativa dada por la OMS (25,00 µg/m^3). (**) µg de PM/ m^3 de aire.

Caracterización de la fracción acuosa.

Los resultados de la caracterización de la fracción acuosa del $PM_{2.5}$ no registraron valores de concentración para Ni, Pb y Cd. Sin embargo, se registraron concentraciones de Fe y Zn (Tabla 2). De acuerdo a la normativa Española (INSHT) (Instituto Nacional de Seguridad y Bienestar en el Trabajo (INSSBT), O.A., 2018) los tres puntos de monitoreo sobrepasaron el límite de exposición permitido para el Fe (1,00 mg/m^3). Como se observa en la Tabla 2, todos los sitios de muestreo, sobrepasan la normativa canadiense (Astete et al., 2014) para Zn (120 µg/m^3).

Tabla 2. *Concentraciones de metales pesados presentes en las 22 muestras del extracto acuoso de material particulado $PM_{2.5}$ de los sitios de estudio, mediante técnica de espectrometría de absorción atómica.*

Sitios de estudio	Fe mg/L	Zn mg/L	Ni mg/L	Pb mg/L	Cd mg/L
P1	1,42	0,11	N.C.	N.C.	N.C.
P2	1,46	0,10	N.C.	N.C.	N.C.
P3	2,25	0,19	N.C.	N.C.	N.C.

Método: Digestión ácida y lectura por espectrometría absorción atómica, Equipo Perkin Elmer Aanalyst 400. Límite de detección de Cadmio: 0,03 mg/L, límite de detección de Plomo: 0,15 mg/L, límite de detección de Níquel: 0,10 mg/L; N.C. =No cuantificado.
En la fracción orgánica de los extractos de $PM_{2.5}$; el único elemento identificado fue el benzo(a) antraceno en el punto P1, con una concentración igual 3,63 ppm.

Caracterización de la fracción orgánica

En la caracterización de los extractos para la determinación de HAPs mediante GC-FID se preparó una curva de calibración a partir de 3, 5, 10 y 25 mg/L del mix HAPs obteniendo un coeficiente de correlación $r2 \geq 0.995$ en cada uno.

En la figura 2 se presenta los tiempos de retención de los compuestos orgánicos en estudio.

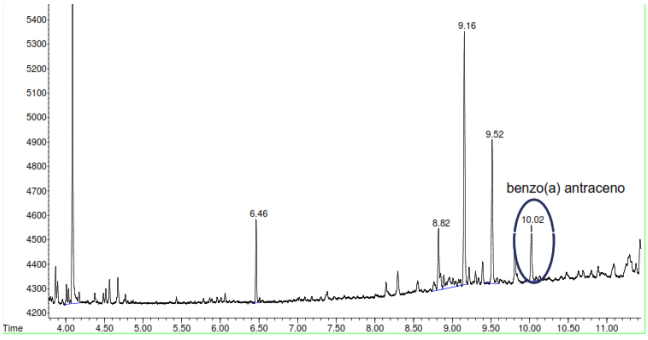


Figura 3: GC-FID del punto P1 presencia de benzo(a) antraceno

Luego se evaluaron las muestras de los extractos dando como resultado en una muestra la presencia de benzo(a) antraceno a un tiempo de retención de 15,656 con una concentración de 3,64 mg/L. (Figura 3).

Ensayo cometa para la evaluación de genotoxicidad.

Se determinó la viabilidad de las células expuestas a los extractos a 0,82

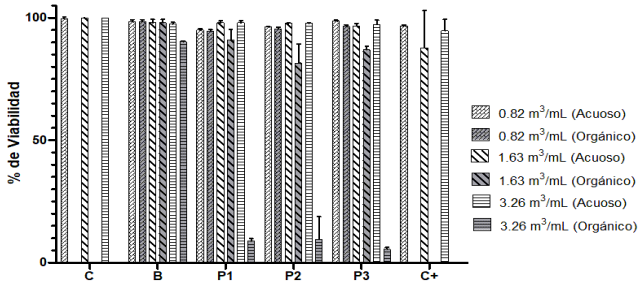


Figura 4: Porcentaje de Viabilidad de células CHO-K1 expuestas a diferentes concentraciones de las fracciones acuosas y fracciones orgánicas. Los datos representan 3 experimentos por duplicado.

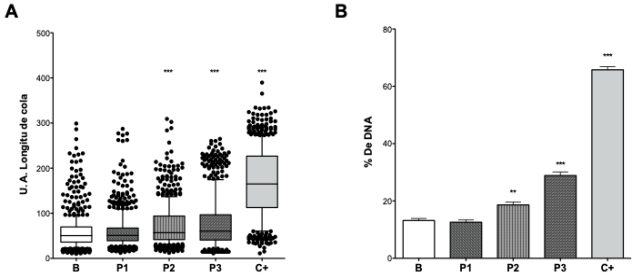


Figura 5: Efectos en el DNA en células CHO expuestas a los extractos acuosos (3,26 m^3/mL). A. Longitud de la cola. B. % de DNA en la cola. Test Kruskal-Wallis y post test Dunns. Los datos representan 3 experimentos por duplicado. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

m^3/mL; 1,63 m^3/mL y 3,26 m^3/mL; sin embargo, la viabilidad de las células en el extracto orgánico a 3,26 m^3/mL fue menor al 20 % mientras que las células expuestas al extracto acuoso en ambas concentraciones la viabilidad es mayor al 90 %, lo que se consideró que los extractos orgánicos se probaran a 1,63 m^3/mL mientras que los extractos acuosos a 3,26 m^3/mL 8 (Figura 4); dosis adecuadas para realizar los ensayos de genotoxicidad. De los dos parámetros analizados del ensayo del cometa asociados a la exposición a 3,26 m^3/mL, los extractos acuosos de material particulado $PM_{2.5}$ indican que hay diferencias significativas ($p < 0,0001$) tanto en la longitud de cola como en el porcentaje de ADN al comparar con el Blanco (B) en los sitios de muestreo P2 y P3 (Figura 5).

Al exponer las células a los extractos orgánicos a una dosis más baja debido a sus efectos en la viabilidad, no existen diferencias significativas de la longitud de cola del cometa entre los puntos y el blanco (B). Sin embargo, en intensidad existe diferencia con respecto al punto P1 (Figura 6).

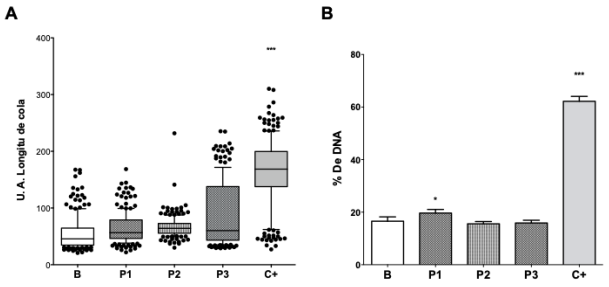


Figura 6: Determinación de los parámetros que afectan el DNA de la línea celular de hámster chino CHO-expuestas a los extractos orgánicos (1,63 m^3/mL) A. Longitud de la cola.B. % de DNA en la cola. Test Kruskal-Wallis y post test Dunns. Los datos representan 3 experimentos por duplicado. * $p < 0.01$;*** $p < 0.0001$

Discusión

Concentración del material particulado 2.5 ($PM_{2.5}$)

Las concentraciones de $PM_{2.5}$ están condicionadas al uso de suelo. Registrándose las mayores concentraciones en los sectores donde la actividad comercial y flujo vehicular son elevados, coincidiendo con lo manifestado por otros investigadores quienes afirman que la mayor frecuencia de exposición a contaminantes mutágenos ocurre en las ciudades con mayor intensidad de tráfico vehicular (Morales y Arias, 2013). Las concentraciones reportadas en los tres sitios de monitoreo superan los 25 µg/m^3, valor límite estipulado en la guía de calidad del aire de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005). Un hallazgo interesante es que el punto de estudio P2, localizado a mayor altitud, presenta menores concentraciones $PM_{2.5}$ coincidiendo con lo manifestado por (Opazo, 2009), quien establece que aquellas estaciones que están ubicadas en lugares muy altos registran los niveles más bajos de contaminación, siendo la altura un factor que influye en la determinación de las concentraciones de PM (Opazo, 2009).

Caracterización de los extractos acuosos

De los elementos caracterizados en el extracto acuoso, el que mostró una tendencia general de niveles más altos fue el Fe. Esta observación es consistente con los resultados reportados en la literatura (Quijano et al., 2010 ; Astudillo et al., 2015). Estudios previos manifiestan que la presencia de este elemento en el aire ambiente podría atribuirse a las fracciones geoquímicas, tráfico vehicular y fuentes industriales (Fernández et al., 2000). Seguido de este se registran concentraciones de Zn, el cual está formando parte de aditivos de lubricantes, además de las fracciones geoquímicas (Ewen et al., 2009). El Fe es un elemento señalado como irritante local para los pulmones y el tracto gastrointestinal al ser inhalado. Además en casos de exposición prolongada a una mezcla de polvo de Fe y otros metales la función pulmonar se ha visto comprometida (Astudillo et al., 2015). Un hallazgo inesperado fue que la caracterización del extracto acuoso de $PM_{2.5}$ no permitió cuantificar concentraciones de Ni, Pb y Cd; probablemente por el limitante de detección del método (Astudillo et al., 2015). Este hallazgo resulta contrario a lo manifestado en otras investigaciones donde se reportan elevadas concentraciones de estos metales (Ewen et al., 2009; Quijano et al., 2014; Quijano et al., 2010; Bełcik et al., 2018), los cuales son responsables de ocasionar efectos genotóxicos. Sería recomendable estudios posteriores que permitan establecer con mayor precisión su concentración.

Caracterización de los extractos orgánicos

Al realizar la caracterización de la fracción orgánica de los extractos de $PM_{2.5}$ en los tres sitios de estudio, no se registran concentraciones para benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno y fenantreno. Este hallazgo fue inesperado, dado que otras investigaciones evidencian que el material particulado tiene como parte de su composición compuestos orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Atkinson y Arey 1994; Hu et al., 2018; Quijano y Meléndez, 2014). La concentración tóxica equivalente de benzo(a) antraceno determinada en el punto P1 igual a 3,635 ppm excede el valor propuesto por la Comisión Europea, cuyo valor límite es de 1 ng/m^3 lo que sugiere que existe riesgo para la salud de los habitantes (Vargas et al., 2013). Una posible explicación de la ausencia de los compuestos podría ser la limitada cantidad de muestra analizada, o el limitante de la detección del método.

Ensayo cometa para la evaluación de genotoxicidad.

Los efectos que ocasionan las diferentes concentraciones de material particulado con metales pesados e hidrocarburos aromáticos sobre las células CHO-K1, se evaluaron mediante los parámetros de longitud de cola y porcentaje de DNA en la cola. En las dosis probadas todas generan un daño en la longitud de la cola, en el caso de la intensidad se observan diferencias con las dosis de los extractos acuosos y sólo con el punto P1 de los extractos orgánicos que es justamente donde se pudo detectar el benzo(a) antraceno. Actualmente la mayoría de estudios mencionan que la exposición a diferentes concentraciones de metales en el aire ambiente puede ser un factor de incremento en la incidencia de cáncer (Pope III et al., 2002). En virtud de ello se recomienda estudios futuros donde se tome en consideración una caracterización completa, donde se vinculen los metales, hidrocarburos y especies iónicas, además mayor número de muestra. Estos hechos coinciden con la investigación de Gutiérrez et al., (2006).

El ensayo cometa presenta mayor ventaja en la detección de genotóxicos, debido a la capacidad de resolver si un agente produce daños en el DNA a bajas dosis, manejo sencillo, bajo costo y reproducible (Afanasieva, 2018). El daño genotóxico causado por los extractos acuosos en la línea celular CHO-K1, medido por la migración del DNA de las células (largo de cola del cometa) podría estar asociado a la presencia de los metales como el Fe y Zn. Otras investigaciones han reportado resultados similares en cuanto a la aplicación de tratamientos acuosos en la línea celular del epitelio alveolar A 549 (Gutiérrez et al., 2006 Astudillo et al., 2015). Es posible que existan variables que podrían estar afectando los resultados como los mecanismos de acción de los componentes y las interacciones entre ellos (Astudillo et al., 2015). Siendo por lo tanto la caracterización de la composición un elemento crucial en la evaluación sobre los efectos en la salud (Gutiérrez et al., 2006). Estudios previos manifiestan que las mezclas de químicos genotóxicos pueden sufrir una variedad de interacciones, que se expresan como aditivas, sinérgicas y antagónicas (Silva et al., 2011; Ortiz et al., 2012; Quintero et al., 2009). En este estudio se encontró también la presencia de benzo (a) antraceno reconocido según la EPA el en grupo 2A como probablemente carcinogénicos para humanos; además se observó la asociación de un parámetro (longitud de cola) del daño genotóxico y el tratamiento con extractos orgánicos, reconociendo que existe una afectación a la salud de la población (Quijano et al., 2014).

Conclusiones

El $PM_{2.5}$ es referido como un contaminante criterio, por la OMS, el cual ocasiona severos problemas de salud en la población expuesta, debido a la asociación de fracciones químicas orgánicas e inorgánicas. Dos áreas de estudio superaron las concentraciones de $PM_{2.5}$ establecidas por la OMS. Los efectos genotóxicos ocasionados sobre la línea celular de hámster chino CHO-K1 por la aplicación de los tratamientos acuosos fueron observados a una concentración de 3,26 m^3/mL en dos áreas de estudio. Para el caso de los extractos orgánicos, estos extractos generan un mayor daño citotóxico por lo que los análisis genotóxicos se realizaron a una concentración de 1,63 m^3/mL. El efecto genotóxico resultó positivo únicamente en el % de DNA en el P1 que pudiera estar relacionado con su composición orgánica. Futuras investigaciones deben considerar el análisis de las fracciones insolubles y evaluar otros tipos de contaminantes que pudieran estar presentes en la fracciones del material particulado. Finalmente el estudio resalta la importancia de generar investigación relacionada con los impactos de este tipo de contaminante, y aportar con información para la elaboración de un marco legal nacional donde se tomen en consideración límites permisibles de los elementos vinculados a este contaminante.

Agradecimientos

El presente trabajo se ha desarrollado en el contexto del Proyecto: "Genotoxicidad del material particulado ($PM_{2.5}$) suspendido en el aire de la zona urbana de Cuenca" Ganador del XIV Concurso de Proyectos de la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca DIUC, financiado por el mismo. Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad de Cuenca, Dirección de Investigación (DIUC), Centro de Estudios Ambientales (CEA) y Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador (PROY_CCSAL_1334) por el respaldo institucional prestado en esta investigación, la cual pretende generar conciencia sobre los problemas de contaminación ambiental en nuestro país y establecer pautas para un cambio sostenible.

Por la contribución técnica al desarrollo de éste trabajo agradecemos a Andrea Álvarez, Katherine Arrobo, Ana Herrera, Cristina Cueva y Diana Brazales.

Bibliografía

1. Afanasieva K, Sivolob A. Physical principles and new applications of comet assay. Biophysical chemistry. 2018; 238 1-7
2. Astete J, Gastañaga M, Pérez D. Niveles de metales pesados en el ambiente y su exposición en la población luego de cinco años de exploración minera en las Bambas de Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2010; 31(4) 695-701.
3. Astudillo A, Ramírez M, García N, González G, Gutiérrez I, Bailón N. Caracterización química del material particulado PM 10 de la zona urbana de Cuenca-Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549. Revista de Toxicología. 2015; 32 (2), 121-126.
4. Atkinson R, Arey J. Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. Environmental Health Perspectives.1994; 102 (4), 117-126.
5. Abou O, Joyeux M, Nerrière E, PierresStrub M, Navier D. Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: an assessment within a personal exposure study. Chemosphere, 2007; 66 (7), 1375-1381.
6. Bełcik M, Trusz A, Zaczyńska E, Czarny A, Piekarska K. Genotoxic and cytotoxic properties of PM2. 5 collected over the year in Wrocław (Poland). Science of The Total Environment, 2018; 637 (638), 480-497.
7. Dockery D, Pope C. Arden. Acute respiratory effects of particulate air pollution. Annual review of public health. 1994; 15 (1), 107-132.
8. Environmental Protectión Agency. Method 610: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: United States: 1984.
9. Ewen C, Anagnostopoulou M, Ward N. Monitoring of heavy metal levels in roadside dusts of Thessaloniki, Greece in relation to motor vehicle traffic density and flow. Environmental Monitoring and Assessment. 2009; 157 (1-4), 483-498.
10. Fernández A, Ternero M, Barragán F, Jiménez J. An approach to characterization of sources of urban airborne particles through heavy metal speciation. Chemosphere-Global Change Science. 2000; 2 (2), 123-136.
11. Gutiérrez M, Roubicek D, Cebrián M, De Vizcaya A, Sordo M, Ostrosky P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. Environmental and molecular mutagenesis. 2006; 47 (3), 199-211.
12. Hu R, Liu G, Zhang H, Xue H, Wang X, Wang R. Particle-Associated Polycyclic
13. Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Atmosphere of Hefei, China: Levels,
14. Characterizations and Health Risks. Archives of environmental contamination and

    toxicology. 2018; 74 (3), 442-451.
15. Instituto Nacional de Seguridad y Bienestar en el Trabajo (INSSBT), O.A., M. P.[sede web]. España. (2018). Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España.[acceso 07 de febrero de 2020]. Disponible en https://www.insst.es/
16. Jones K, Senft J. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. Journal of .Histochemistry & Cytochemistry. 1985; 33 (1), 77-79.
17. Lacasaña M, Aguilar C, Romieu I. Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en tres megaciudades de América Latina. Salud pública de México. 1999; 41 (3), 203-215.
18. Legal Information Institute. [Sede web]. New York. Cornell Law School. 2006 [actualizado 17 de octubre 2006, acceso 07 de febrero de 2020]. Disponible en https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/appendix-O_to_part_50.
19. Lexis Finder [sede web]. Ecuador. Registro Oficial - Edición Especial No. 387 2015; [actualizado el 04 de noviembre de 2015, acceso 07 de febrero de 2020] Disponible en http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/Acuerdo-097.pdf.
20. Morales T, Arias J. Contaminación Vehicular en la Conurbación Pereira-Dosquebradas. Revista Luna Azul. 2013; 37, 101-129.
21. Olive L, Banath J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." Nature Protocols. Health and Medicine 2006; 1 (1), 23.
22. Opazo D. Distribución espacial de la contaminación por material particulado y su relación con las temperaturas del aire y los vientos en Santiago para el año 2009. [Tesis en Internet]. Universidad de Chile. Chile: 2011 [acceso 3 de febrero de 2020]. Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2011/aq-opazo_d/pdfAmont/aq-opazo_d.pdf.
23. Ortiz I, Peláez C, Orozco L, Zuleta M. Interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias mediante ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. Biomédica. 2012; 32 (3), 437-448.
24. Quijano A, Meléndez I, Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (haps) en el aire de Cúcuta-Colombia: Efecto gen tóxico. Revista EIA. 2014; 11 (21), 79-87.

25. Organización Mundial de la salud y equipo de salud ambiental. (2006). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre: actualización mundial 2005. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. https://apps.who.int/iris/handle/10665/69478.

26. Pope III C, Burnett R, Thurston G, Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. Jam. 2002; 287 (9), 1132-1141.

27. Porredon C, Ramos D, Serret J, González J, Borrás M, De Lapuente J. Basis for the toxicological evaluation of engineered nanomaterials. Revista de Toxicología. 2014; 31 (1), 9-22.

28. Quijano A, Quijano M, Henao A. Caracterización fisicoquímica del material particulado fracción respirable PM2.5 en Pamplona-Norte de Santander-Colombia. Bistua: revista de la facultad de Ciencias Básicas. 2010; 8 (1), 1-20.

29. Quintero M, Valencia A, Ortiz I. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. Medicina UPB. 2009; 28. (1), 33-41.

30. Quijano A, Meléndez I. Identificación de hidrocarburos aromáticos Poli cíclicos (HaPs) en el aire de Cúcuta-Colombia: Efecto Gentóxico. Revista EIA; 2014; 11(21), 79-87.

31. Silva M, Rojas E, Valverde M. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. Oxidative medicine and cellular longevity. 2011; 2011 (2), 935160.

32. Sahagún, M. Efecto genotóxico de la partículas Atmosféricas Urbanas. [Tesis en Internet]. Tesis Doctoral. Tesis de Pregrado. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIIEMAD):2009 [acceso 3 de febrero del 2020]. Disponible en: https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/7530/EFECTOGENO.pdf?sequence=1

33. Shah A, Langrish J, Nair H, McAllister D; Hunter A, Donaldson P. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. The Lancet. 2013; 382 (9897), 1039-1048.

34. Sienra M, Préndez M, Romero R. Metodología para la extracción, fraccionamiento y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en material particulado urbano. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 2002; 47(4), 311-324.

35. The Perkin-Elmer Corporation. Atomic Absorption Spectroscopy Analytical Methods. Unites States of America. The Perkin-Elmer Corporation. 1996.

36. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. Journal of Environmental Science and Health, Part C. 2008; 26. (4), 339-362.

37. Vargas M, Romero G, Palencia A, Rivero E, Pinero S. Equivalentes tóxicos de hidrocarburos aromáticos políciclicos en particulado atmosférico en Valencia, Venezuela. Acta toxicológica argentina. 2013; 21 (2), 69-77.

38. Vasconcellos P, Balasubramanian R, Bruns R, Sanchez O, Andrade M, Flues M. Water-soluble ions and trace metals in airborne particles over urban areas of the state of São Paulo, Brazil: influences of local sources and long range transport. Water, air, and soil pollution. 2007; 186. (1-4), 63-73.

Paresia radial bilateral secundaria a exposición crónica a plomo: reporte de un caso

Gabrielli TA[1], Voitzuk AP[1], Greco V.[1], Osorio P.[1], Alava Arteaga JR[1], Juárez FJ[1], Taiman JN[1], Gallo IM[2]*

[1]Centro Nacional de Intoxicaciones, Hospital Prof. Alejandro Posadas, Buenos Aires, Argentina.
[2]Laboratorio de Toxicología, Hospital Prof. Alejandro Posadas, Buenos Aires, Argentina.

Resumen: La exposición ocupacional al plomo continúa siendo un problema de salud pública que afecta mayoritariamente a trabajadores de países en vías de desarrollo. La exposición crónica produce síntomas similares a otras patologías clínicas motivo por el cual es importante poseer alto grado de sospecha. De acuerdo con los síntomas, signos y valor de plumbemia inicial, será necesario el alejamiento de la fuente y posterior tratamiento quelante con edetato cálcico disódico y/o dimercaprol. Presentamos un caso clínico de paresia radial bilateral por exposición crónica a plomo.

Palabras Clave: Plomo, exposición ocupacional, paresia, quelante, EDTA, BAL

Abstract: ***Bilateral radial paresis secondary to chronic lead exposure: a case report***

Occupational exposure to lead continues to be a public health problem, affecting mainly workers of developing countries. Chronic exposure produces symptoms that can be confused with other clinical pathologies, which is why it is important to have a high degree of suspicion. According to the symptoms, signs and value of initial blood lead concentration, it will be necessary to remove from the source and posterior chelation with edetate calcium disodium and/or dimercaprol. We present a clinical case of bilateral radial paresis due to chronic lead exposure.

Keywords: Lead poisoning, occupational exposure, paresis, chelator, EDTA, BAL

Introducción

La intoxicación crónica por plomo es un problema de distribución mundial propio de la era moderna siendo, la mayoría de los casos, resultado de la exposición industrial por reciclado de baterías. La forma clásica de neuropatía involucra debilidad de las muñecas y de los extensores de los dedos que, posteriormente, puede afectar otros músculos. Hay afectación sensorial mínima con una baja correlación entre los niveles de plumbemia y neuropatía periférica, particularmente para el patrón subagudo (Thomson et al, 2006).

Caso clínico

Paciente de sexo masculino de 40 años sin antecedentes de relevancia que consulta derivado de otro centro asistencial por debilidad y dolor en miembros superiores (en tratamiento con pregabalina a dosis habituales). Como antecedente laboral trabajó durante 10 años en fundición de plomo y reciclado de baterías con jornadas laborales de 12 horas diarias. Se solicitó plumbemia inicial cuyo valor fue de 70.5 mcg/dL y electromiograma (EMG) con resultado de denervación y déficit de unidades motoras en territorio de ambos nervios radiales, cuya estimulación provocaba respuestas de baja amplitud. La velocidad de conducción en ambos nervios mediales y cubitales era normal. En el examen físico se evidenciaba paresia de ambos miembros superiores (figura 1) con arreflexia estilorradial bilateral, hiporreflexia bicipital e hipopalestesia distal, ribete de Burton, dolor abdominal inespecífico y debilidad en miembros inferiores. En el laboratorio al ingreso presentaba Hto: 29.7%, Hb 9.5 g/dL, ASAT (aspartato aminotransferasa) 46 UI/L y ALAT (alanino aminotransferasa) 48 UI/L. Fue evaluado por el servicio de Neurología quien diagnostica una polineuropatía motora – sensitiva de miembros superiores de probable etiología tóxica.

*e-mail: *gabrielli.tomas87@gmail.com*

Figura 1: Paresia de miembros superiores.

Se realizó tratamiento quelante durante 5 días con EDTA Ca con buena tolerancia y se inicia kinesiología motora asociado a pregabalina y amitriptilina, con mejoría parcial de la dorsiflexión de ambas manos. Presentó una plumbemia postquelación de 44.8 mcg/dL, cifra próxima al límite máximo biológico establecido en 40 mcg/dL.

Discusión

En nuestro medio la *fuente de exposición* más habitual es la exposición crónica laboral en fábricas de reciclado de baterías.

En cuanto a la *fisiopatología* de la neurotoxicidad se cree que es producida por varios mecanismos incluyendo apoptosis, alteración de neurotransmisores (acetilcolina, noradrenalina, GABA, glutamato y sistemas dependientes de NMDA) y segundos mensajeros. A su vez habría mecanismos de daño mitocondrial, endotelial cerebrovascular, así como daño en oligodendrocitos y astroglía con alteración de la formación de mielina (Nelson et al., 2014).

El plomo es capaz de atravesar las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE) a través de las Ca^{+2}- ATPasas gracias a su similitud con el calcio (Wani et al., 2015). Posteriormente se acumula en las células astrogliales que contienen proteínas con enlaces de plomo. Estudios clásicos demostraron que se acumula más en dichas células que en las propias neuronas (Thomas et al., 1973; Lindhal et al., 1999). Los efectos tóxicos del plomo son más pronunciados en el sistema nervioso en desarrollo al causar daño en las células astrogliales inmaduras y obstruir la formación de la vaina de mielina, ambos factores implicados en el desarrollo de la BHE (Flora et al., 2012). De hecho, se sabe que el coeficiente intelectual (CI) disminuye de 2-4 puntos por cada mcg/dL en el rango entre 5 a 35 mcg/dL (Brunton, 2007).

La disfunción motora, detectada por electrofisiología, puede ocurrir con niveles a partir de 40 mcg/dL (Klaassen, 2001).

En cuanto a la *clínica neurológica*, produce una polineuropatía motora que afecta los cuatro miembros (puede ir precedida de debilidad primero en manos y luego en pies) y disminuye la velocidad de conducción en el electromiograma. A su vez, puede generar convulsiones, encefalopatía plúmbica (especialmente en niños, merced a la mayor permeabilidad de su barrera hematoencefálica), edema cerebral y

aumento de la presión intracraneana.

La mayoría de neuropatías tóxicas son predominantemente sensoriales y la pérdida sensitiva se da en un patrón longitud – dependiente con los pies involucrados primariamente y luego otras regiones más proximales. La debilidad tiende a afectar los extensores del dedo medio y anular antes de afectar el resto de los dedos y extensores del pulgar y de la muñeca. Raramente puede dañar músculos proximales, incluida la cintura escapular (Thomson et al., 2006). En el caso de los miembros inferiores habitualmente se afecta la dorsiflexión y extensión del pie. Es de destacar que hay descritos históricamente casos de lesión cervical, bulbar y de músculos extraoculares (Aub et al, 1925) así como progresión a cuadriplejía (Oh, 1975). Así, el patrón motor suele ser ligeramente asimétrico, en parte, por la actividad muscular. La debilidad tiende a ser mayor en la mano dominante (Aub et al, 1925; Cantarow y Trumper, 1944). En cuanto a la sensibilidad, puede afectar todas las modalidades, siendo su presentación infrecuente. Se cree que la afectación muscular pura es más frecuente en la exposición subaguda a altas concentraciones, mientras que la presentación típica (motor, sensitiva y autonómica) es patrimonio de exposiciones crónicas (generalmente superiores a 10 años) a concentraciones más bajas (Rubens et al., 2001; Thomson et al, 2006).

El pronóstico de recuperación es bueno si el paciente se aleja de la fuente y depende del grado de gravedad inicial como ya indicara Windebank (1993). De hecho, los pacientes con debilidad motora subaguda generalmente mejoran después de la baja laboral. Por el contrario, no se encontró evidencia de que los pacientes con trastornos sensoriales y exposición crónica al plomo mejoren durante sus primeros años después de detener la exposición (Rubens et al., 2001).

Es de destacar que la neuropatía plúmbica comparte numerosas similitudes con la presente en la porfiria cutánea. Al igual que en esta última, se evidencian dolores abdominales cólicos, constipación y neuropatía predominantemente motora con debilidad de patrón inusual (carece de la distribución distal típica de las neuropatías tóxicas). La afectación sensitiva es más común en la porfiria cutánea, así como la repercusión en nervios craneales y sistema autonómico. Los biomarcadores ácido delta- amino levulínico (ALA) y las coproporfirinas están elevados en sangre y orina de ambos tipos de pacientes (Thomson et al, 2006).

En cuanto al *diagnóstico* se deberá solicitar la plumbemia (PbS) y, adicionalmente, ácido delta aminolevulínico dehidratasa (δ ALA-DH) en sangre. Si bien no hay niveles seguros de plomo en sangre, podría aceptarse hasta 5 mcg/dL en niños, 10 mcg/dL en adultos no expuestos, y 30 mcg/dL en mujeres adultas en edad fértil expuestas y 40 mcg/dL en trabajadores adultos expuestos.

En el caso de sospecha de neuropatía se deberá solicitar electromiograma de los cuatro miembros con velocidad de conducción motora y sensitiva. El electroencefalograma, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) deberán ser efectuados ante la presencia de convulsiones y/o para la valoración de secuelas (Talamoni et al., 2014).

El tratamiento incluye el alejamiento de la fuente y tratamiento quelante con EDTA Ca y BAL. Este último atraviesa la BHE y actúa en los espacios intra y extracelular. Una vez realizado el tratamiento quelante se repetirá la plumbemia a los 15 días, evaluando necesidad de nuevos ciclos de tratamiento.

Es fundamental el inicio de terapia de rehabilitación kinésica precoz a fin de aminorar las secuelas, así como también, el apoyo psicoterapéutico de los pacientes, teniendo en cuenta la incapacidad temporal o permanente que puede generar la afectación del miembro. Es frecuente la aparición de depresión en los pacientes laboralmente activos por la pérdida de función motora.

La higiene en los centros de trabajo es fundamental para prevenir la exposición excesiva a plomo. Los trabajadores deben contar con medidas de protección personal adecuadas, debiendo contemplar áreas independientes para comer y zonas de aseo personal y limpieza de ropa de trabajo en el propio trabajo con el fin de prevenir exposición familiar. Así mismo, se deberán monitorizar rutinariamente los límites ambientales propuestos por la ACGIH (Albiano y Villaamil Lepori, 2015).

Bibliografía

1. Albiano N, Villaamil Lepori E. Toxicología Laboral. Buenos Aires: Emede; 2015. p.102-112.
2. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. TLVs and BEIs. Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemicals Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati: ACGIH; 2015.
3. Aub JC, Fairhall LT, Minot AS, Reznikoff P. Lead poisoning. Medicine. 1925; 4, 1–250.
4. Brunton LL, Goodman LS, Blumenthal D, Buxton I, Parker KL. Goodman and Gillmans Manual of Pharmocology and Theraupetics. New York: Mcgraw Hill Professional; 2007.
5. Calello DP, Henretig FM. Lead. En Nelson et al., Goldfrank´s Toxicologic Emergencies. 10 ed. Nueva York: McGraw Hill Education; 2014. p. 1219-1231
6. Contartese CM., Gallo IM., Repetto MV. Procedimiento normalizado de operación para la determinación de plomo en sangre entera por Absorción Atómica Atomización Electrotérmica (Horno con Plataforma) del Laboratorio de Toxicología del Hospital Nacional Prof. Alejandro Posadas (8va ed.). Buenos Aires; 2020.
7. Flora G., Gupta D., Tiwari A. Interdiscip Toxicol. 2012; 5(2): 47–58.
8. Klaasen CD et al. Cassarett and Doull´s Toxicology: The basic science of poisons. Estados Unidos: McGraw – Hill; 2001. p. 827 – 834.
9. Lindahl, L. S., Bird, L., Legare, M. E., Mikeska, G., Bratton, G. R., and Tiffany-Castiglioni, E. Differential ability of astroglia and neuronal cells to accumulate lead: Dependence on cell type and on degree of differentiation. Toxicol. Sci. 1999; 50, 236–243.
10. Oh SJ. Lead neuropathy: case report. Arch Phys Med Rehabil. 1975; 56:312–317.
11. Rubens, O. Peripheral neuropathy in chronic occupational inorganic lead exposure: a clinical and electrophysiological study. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 2001; *71*(2), 200–204. https://doi.org/10.1136/jnnp.71.2.200
12. Talamoni M., Voitzuk AP. Metales. En Talamoni M., Crapanzano G. Greco V, Guía de diagnóstico y tratamiento en toxicología. 2da ed. Buenos Aires: Eudeba; 2014. p. 125-130.
13. Thomas, J. A., Dallenbach, F. D., & Thomas, M. The distribution of radioactive lead (210pb) in the cerebellum of developing rats. The Journal of Pathology. 1973; 109(1), 45–50. https://doi.org/10.1002/path.1711090106
14. Thomson, R. M., & Parry, G. J. Neuropathies associated with excessive exposure to lead. Muscle & Nerve. 2006; *33*(6), 732–741. https://doi.org/10.1002/mus.20510
15. Wani, A. L., Ara, A., & Usmani, J. A. Lead toxicity: a review. Interdisciplinary Toxicology. 2015; *8*(2), 55–64. https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009
16. Windebank AJ. Metal neuropathy. En Dyck PJ, Thomas PE, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF, Peripheral neuropathy. Philadelphia: WB Saunders; 1993. p. 1549–1570.

Induction of Genetic Alterations and Oxidative Stress in Giant African Land Snail (*Limicolaria aurora*) Exposed to Municipal Waste Leachate

Ugokwe C. U. [1]*, Okafor F. C[1]., Okeke P. C[2]., Ezewudo B. I[1]., Olagunju T.E [3]

[1]Department of Zoology and Environmental Biology, University of Nigeria, Nsukka, Enugu State, Nigeria.
[2]Opec Entomology Consult, Awka, Anambra State, Nigeria
[3] Department of Biology/Microbiology/Biotechnology, Alex Ekwueme Federal University, Ndufu-Alike Ikwo, Nigeria

Abstract: Uncontrolled waste disposal has continuously threatened the health of the surrounding environment through the leaching of hazardous xenobiotics. Systemic toxicity and genotoxicity potential of waste leachates from Onitsha municipal dumpsite were investigated in giant African land snail (*Limicolaria aurora)* through oxidative stress biomarker and micronucleus test assessment respectively. Physicochemical indices were evaluated in the leachate following standard protocols. Snails were exposed to different concentrations (0, 6.25, 12.5, 25.0 and 50.0%) of waste leachate for 21 days; oxidative stress biomarkers and micronucleus analysis performed on snail digestive gland and hemocyte respectively. The leachate induced dose-duration dependent increase ($P< 0.05$) in Superoxide dismutase, Catalase, malondialdehyde and Glutathione peroxidase levels with associated decrease in total protein concentrations in the exposed snails compared to the control. Similarly, the frequency of micronucleus and other nuclear abnormalities shows concentration dependent increase ($P< 0.05$) in treated groups. This observed genotoxic effect might be induced by the oxidative stress, via the production of reactive oxygen species. This shows that waste leachate contains hazardous and genotoxic compounds capable of inducing oxidative stress and DNA damage. Therefore, continuous exposure of waste leachate into the environment could pose a grave health risk to the surrounding biota, humans included.

Keywords: Biochemical, Giant African Land Snail, Micronucleus, Nigeria, Waste Pollution.

Introduction

Uncontrolled urbanization and high population growth results in waste generation increase, with serious environmental implications when the rapid growing waste rates are not effectively disposed. Management of municipal solid waste has become a grave problem in most developing countries. In Nigeria, per day, more than 12 million tons of solid wastes is generated, of which less than 28% are efficiently managed, with landfilling and/or open dumping common methods for these waste disposals (Adetoro *et al*., 2018). This method of waste management is a known source of environmental pollution, which can cause severe impact on human and environmental health (Gupta *et al*., 2019). Improperly disposed wastes in landfills/dump sites undergo series of biological and chemical changes that results in the formation of toxic leachate (Ghosh *et al*., 2017).

Waste leachate is generated due to filtration of water through waste and/or moisture containing by-products of biochemical interactions that occur in the dumpsite (Ghosh *et al*., 2017). Leachate transports organic and inorganic compounds, in downward and outward movement, conveying contaminants from the landfill (Zin *et al.*, 2012). This has become a major source of pollution for underground and immediate surface water ecosystems (Li *et al*., 2017). Waste leachates are highly complex in nature; consisting of numerous toxic compounds such as macro-inorganic compounds, phenols, heavy metals, pesticides and pathogens. Combined, these compounds can bio-accumulate in aquatic organisms, eventually reaching to animals and humans through the food chain (Zhao *et al*., 2017). Studies have strongly suggested that pollutants present in leachates have harmful effects on some living cells (Adetoro *et al*., 2018; Gupta *et al*., 2019). This poses concerns on the health safety of the environment, animals and humans, hence, it has become imperative to monitor and evaluate waste leachate toxicity.

Generally, leachate assessment is based on identification of pollutants through chemical analyses which can only detect a slight amount of the toxic compounds present in leachate samples (Ghosh *et al*., 2017), however, evaluation of leachate can also be assessed on the interactions with biota (Tsarpali *et al*., 2012). Bioassay toxicity tests can evaluate effects on organisms and can detect toxicity even when the pollutants are not detected by chemical analysis. It integrates the effect of all contaminants and provides indication on their bioavailability (Tsarpali *et al*., 2012).

Animal use in evaluating the toxicity of waste leachates has become a well-established practice. Land snails, have an ecological role and importance as the most species-rich group of terrestrial mollusks and are broadly acknowledged as being an effective bioindicator of environmental stress. They are easily used in evaluating terrestrial pollution (Vega *et al*., 2012), due to their wide distribution, easy sampling and capability to bio accumulate pollutants (Anim *et al*., 2011).

Onitsha, one of the major cities in Anambra State, southeastern Nigeria, is one of the most important commercial hubs in sub-Sahara Africa with significant human population. It has the biggest municipal waste dump, situated along Onitsha-Owerri road, Obosi, and receive most of the solid waste from Onitsha metropolis. Leachate collection and treatment system is lacking in this dumpsite; thus, leachates generated from the waste are easily discharged into the surrounding aquatic and terrestrial environmental media. Hence, this study aimed at evaluating the systemic toxicity and genotoxicity potential of waste leachate from Onitsha municipal waste dumpsite in giant African land snail (*Limicolaria aurora*) via oxidative stress and micronucleus test assessment respectively.

Materials and Methods

Leachate collection

Obosi dumpsite situated at Onitsha-Owerri road, Ogbaru Local Government (latitude 6º06′ 12`N and longitude 6º48′ 43`E) Anambra State, was chosen as the collection site for leachate sample. This site is the primary municipal dumping site of Onitsha and its metropolitan area for over 10 years. Dumping of waste at this site is unrestricted and contains mixtures of both organic and inorganic waste materials, including industrial, agricultural, domestic and medical wastes. Raw leachates were collected from different leachate wells in the dumpsite, thoroughly mixed to provide a representative leachate sample. The leachate was taken to the laboratory in pre-washed 5-liter plastic container and stored at 4ºC until use.

Leachate characterization

Leachate analysis was done by measuring the physical and chemical components of the leachate. Parameters such as pH, electrical conductivity, total dissolved solid (TDS) and Dissolved oxygen (DO), were determined in-situ with a digital Multimeter (TOPAC INSTRUMENTS INC). Chloride, phosphate, Nitrate, ammonia, sulphate, total hardness, total alkalinity, biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) were determined according to APHA (2012). The concentrations of heavy metals; Iron (Fe), Lead (Pb), Copper (Cu), Zinc (Zn), Cadmium (Cd) and Chromium (Cr) were carried out using Buck Scientific Atomic absorption

*e-mail: *ugokwecollins@gmail.com*

spectrophotometer, after digestion with a mixture of $HClO_3$ and HNO_3 (ratio of 1:2), according to USEPA (1996) and APHA (2012) .

Biotoxicity Test

Adult giant African land snails (Limicolaria aurora) (average weight; 10.47± 0.42g) were used as test organism to assess the toxicity of the collected waste leachate. These land snails are delicacy in diets of rural communities (Ebenso *et al*., 2004b), they play an important ecological roles and have been recognized as a suitable bioindicator of environmental stress due to their ability to bio accumulate compounds (Ebenso *et al*., 2004a,b; Ebenso *et al*., 2005; Anim *et al*., 2011). The snails were commercially acquired from a snail farm in Nsukka, Enugu State, and transported to the animal house of the Department of Zoology and Environmental Biology, University of Nigeria, Nsukka. They were kept in plastic boxes 12 x 12 x 60cm^3 with lids punctured for ventilation, under constant conditions with a temperature cycle of 27 ± 2^{o}C. They were acclimatized for six (6) days according to the method described by Ebenso *et al*. (2004a) and fed *ad libitum* with fresh green pawpaw (*Carica papaya*) leaves. The use of these snails was in accordance with the guidelines on the use of animals for research as stated by the institutional animal care committee of University of Nigeria Nsukka. The experiment was conducted under the natural photoperiod prevalent at Nsukka (Nigeria) in the month of August.

The treatment groups comprises of five different concentrations (0, 6.25, 12.5, 25.0 and 50.0%) of the leachate sample (v/v; leachate: dechlorinated tap water). Sterile Loamy soil was placed at base of different boxes of each group (each in triplicate) up to 2cm deep, and moistened with the different treatment solutions respectively. This acted as both substrate and source of exposure. Ten (10) snails each were randomly allotted to each plastic box of each concentration. Oral application of different leachate samples was also given to the snails using chopped pawpaw (*C. papaya*) leaves. This was done by immersing the pawpaw leaves in their respective leachate concentrations before feeding it to the snails. Snails were fed and watered twice a week. During the 21-day exposure period, three (3) snails from each group were randomly selected at interval (day 1, 7, 14 and 21).

Haemolymph was collected through the hemal pore according to the methods of Sminia and Barendsen (1980). Briefly, the foot of the snail was stimulated with the tip of micropipette; extruded hemolymph was collected with micropipette for micronucleus test after the snail deeply retract into its shell. The snails were later euthanized and the digestive gland dissected out for evaluation of oxidative stress parameters.

Biochemical Assays

Estimation of Lipid Peroxidation: Lipid peroxidation was estimated by determining the concentration of malondialdehyde (MDA) equivalents produced by reaction with 0.6% thiobarbituric acid (El-Moshaty *et al*., 1993). Absorbance was determined at 532 nm and the result expressed in µmol/mg proteins.

Estimation of Superoxide dismutase (SOD): Superoxide dismutase activity was measured by Nitro Bluetetrazolium (NBT) spectrophotometry as described by the method of Zhu *et al*. (1990). Xanthine and xanthine oxidase generated superoxide anion radicals, which react with 2-(4-indophenyl)- 3(4-nitro-phenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (NBT) to form a red formazan dye. Inhibition of 50% of the reaction was defined as one unit of superoxide dismutase enzyme. Absorbance was determined at 560 nm and the result expressed as units/mg proteins.

Estimation of Catalase: Catalase (CAT) activity was determined spectrophotometrically according to the method of Zhang *et al.* (2010), by measuring the decrease of absorbance at 240 nm in a reaction mixture containing 0.3 ml H_2O_2 (0.1 M) and 0.1 ml extract. The result was expressed as µmol/mg of proteins.

Estimation of Glutathione Peroxidase: The level of Glutathione peroxidase (GPx) was measured in a cuvette with a solution consisting of 2 µg protein homogenate, 50 mM potassium phosphate buffer, 0.4mM EDTA, 0.15 mMβ-NADPH, 1unit glutathione reductase, and 1 mM glutathione (reduced) according to the method of Livingstone *et al*. (1992). The change in absorbance was determined based on the decrease of NADPH at 340 nm for 1 min and was expressed as µmol/mg of proteins.

Estimation of Total proteins: The protein concentration was determined according to Bradford (1976) method, based on the reaction of proteins with Coomassie Brilliant Blue G-250 dye. The calibration curve was prepared with bovine serum albumin (BSA) and absorbance read in a spectrophotometer at 595 nm.

Micronucleus assay

Micronucleus test was evaluated on snail hemocytes according to the methods of Villela *et al*. (2007). The collected hemolymph was added to 1ml of 0.075 M potassium chloride in a tube and maintained under incubator at 34^{0}C for 1hr. Samples were centrifuged at 550×g for 10 min; supernatants were removed and drop of cell suspensions smeared on clean microscopic slides, and then allowed to air-dry at room temperature. The cells were fixed in absolute methanol for 5 min, allowed to air-dry and subsequently stained with 5% Giemsa for 10 min. Total of 2000 hemocytes were scored per sample under a light microscope (1000× magnification) and results recorded as micronucleus frequency (MN frequency). The mean frequencies of each category were estimated and expressed per 1000 cells (%).

Statistical Analysis

Two-factor analysis of variance (ANOVA) was used to examine the effects of leachate concentrations and exposure durations on the level of oxidative stress parameters, and frequency of nuclear abnormalities in snails. The means were separated using Turkey's test at 0.05% significance level. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant. The analysis was done using R statistical software, version 3.5.3.

Result

Physicochemical characteristics of leachate

The values of phosphate, sulphate, COD, sodium, BOD, EC alkalinity, TDS, nitrate, ammonia, and chloride ion analysed were higher than regulatory safe limits (Table 1). Equally, the leachate concentrations of heavy metals; lead, cadmium, Chromium, copper, iron and zinc were higher compared to standard permissible limits (Table 1).

Effects of waste leachate exposure on oxidative stress parameters in Limcoraria aurora

Concentration and duration of waste leachate exposures influenced the levels of oxidative stress indices in *Limicoraria aurora* (Table 2). The mean level of SOD and CAT was significantly ($P < 0.001$) higher in those exposed to the different concentrations of leachate compared to those of the control group (Figures 1 and 2). With respect to the duration of exposure, the mean levels of SOD observed on days 14 and 21 was significantly higher than those of days 1 and 7. No significant difference was observed between day 1 and 7, nor between day 14 and 21 in the mean SOD levels (Figure 1). The highest level of CAT was also observed on day 14 and 21, which was significantly different from those of day 7 and 1 (Figures 2).

Comparing snails exposed to leachate treatment to the control, the levels of malondialdehyde (MDA) and Glutathione Peroxidase (GPx) were observed to be significantly higher in the snails treated with leachate, compared to the control. There was, however, no significant difference in the levels of MDA and GPx for the different concentrations of

Table 1. *Physicochemical characteristics of Onitsha Municipal Waste leachate.*

Physicochemical Parameters[+]	Leachate Sample	Standards	
		NESREA	USEPA
pH	8.20 ± 0.1	6.0 – 9.0	6.5 – 8.5
COD (mg/l)	464 ± 74.9	90	410
BOD (mg/l)	263 ± 52.8	50	-
TDS (mg/l)	1328.73 ± 69.3	500	500
Hardness (mg/l)	259 ± 173.9	-	0 -75
Alkalinity (mg/l)	387 ± 116.4	150	20
EC (µs/cm)	383 ± 50.6	125	-
Chloride (mg/l)	951 ± 164.9	250	250
Ammonia (mg/l)	16.82 ± 5.2	1.0	0.02
Phosphate (mg/l)	288.39 ± 10.9	2.0	-
Nitrate (mg/l)	14.03 ± 1.5	10	10
Sulphate (mg/l)	379.02 ± 16.4	250	250
Sodium (mg/l)	47.92 ± 1.2	0.50	-
Potassium (mg/l)	55.18 ± 0.6	100	-
Calcium (mg/l)	38.04 ± 3.2	50	-
Lead (mg/l)	0.73 ± 0.2	0.05	0.015
Cadmium (mg/l)	0.47 ± 0.2	0.2	0.05
Chromium	1.93 ± 0.5	0.05	0.01
Copper (mg/l)	2.05 ± 0.2	0.5	1.0
Iron (mg/l)	14.74 ± 4.5	-	0.3
Zinc (mg/l)	7.32 ± 2.7	6.0 – 9.0	-

Key: NESREA=National Environmental Standards and Regulations Enforcement Agency, USEPA=United State Environmental Protection Agency, COD= Chemical Oxygen Demand, BOD =Biological Oxygen Demand, TDS = Total Dissolved Solids, EC=Electrical Conductivity. Values are mean of three replicate determination (n = 3) ± standard deviations

Table 2. *Influence of leachates treatment effects on oxidative stress indices in L. aurora.*

Parameters	SOD	CAT	MDA	GPx	TP
Concentration	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Duration	0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Concentration x Duration	Ns	Ns	ns	Ns	ns

***ns** = not significant*

leachate (Figures 3 and 4). With respect to the duration of exposure to leachate, a significant increase in the mean level of MDA was observed on day 7 of exposure. This increase was not significantly different in days 14 and 21 (Figure 3). On the other hand, a significant increase in the mean level of GPx was observed on day 14 of exposure. This increase was not significantly different in day 21 (Figure 4).

The mean level of Total protein (TP) was observed to be significantly lower in snails treated with leachate, compared to the control snails. There was, however, no significant difference in the level of TP for the different concentrations of leachate. Upon exposure to waste leachate for different duration of time, the mean level of TP was observed to be highest on day 1 and lowest on day 21 (Figure 5).

Effects of waste leachate concentration and duration on the frequency of micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities (NA)

The frequency of micronuclei (MN) in snails exposed to leachates was significantly influenced by both concentration and duration of exposure, whereas the frequency of other nuclear abnormalities (NA) was significantly influenced by only the concentration of the leachates.

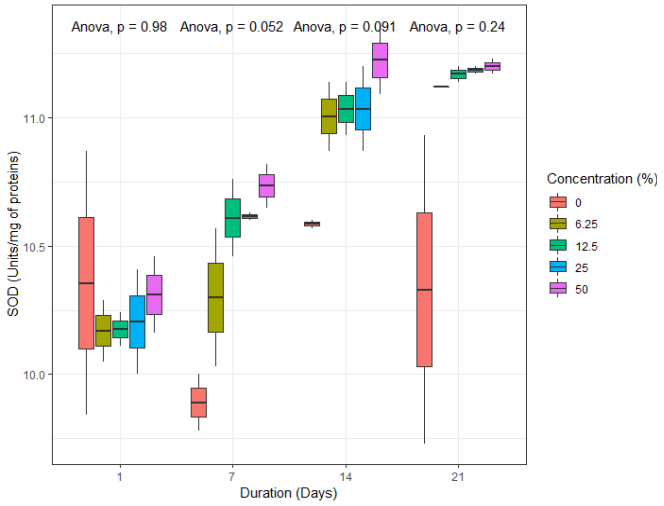


Figure 1: Boxplot of the mean levels of SOD in snails exposed to different concentrations of leachate, grouped by their duration of exposure.

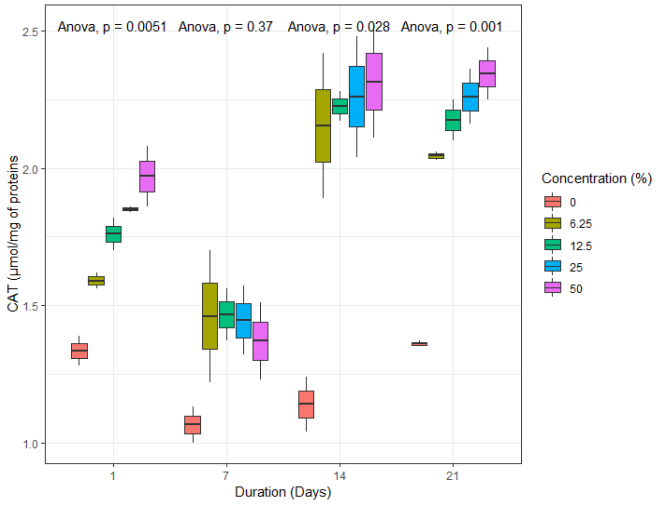


Figure 2: Boxplot of the mean levels of CAT in snails exposed to different concentrations of leachate, grouped by their duration of exposure.

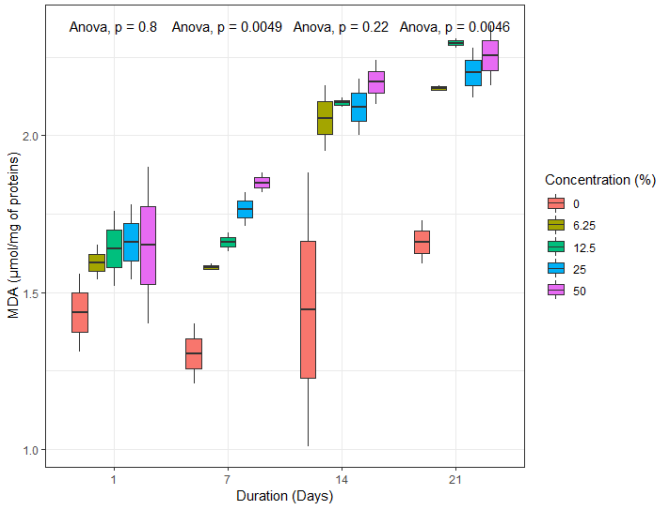


Figure 3: Boxplot of the mean levels of MDA in snails exposed to different concentrations of leachate, grouped by their duration of exposure.

(Table 3). The mean frequency of MN in snails exposed to leachate treatment was significantly higher than those of the control snails. A change in the leachate concentration, however, had no effect on the frequency of MN in those snails exposed to leachate treatment. With

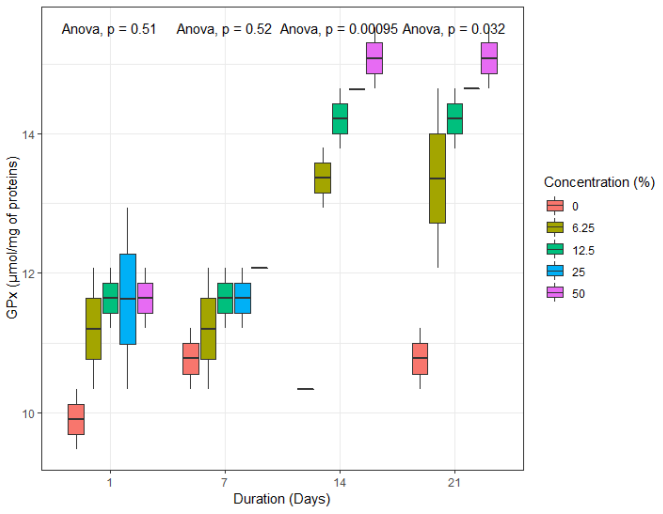


Figure 4: Boxplot of the mean levels of GPx in snails exposed to different concentrations of leachate, grouped by their duration of exposure.

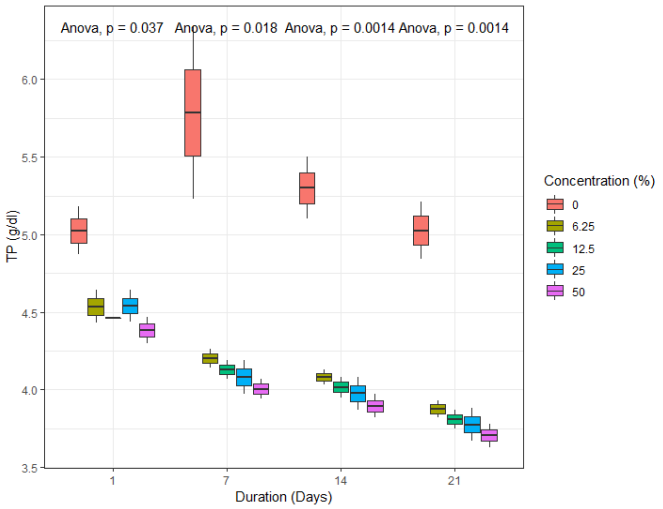


Figure 5: Boxplot of the mean levels of TP in snails exposed to different concentrations of leachate, grouped by their duration of exposure.

Table 3. *Influence of treatment effects on the frequencies of micronucleus (MN) and nuclear abnormalities (NA) for leachates.*

Parameters	Micronuclei (MN)	Nuclear abnormalities (NA)
Concentration	< 0.001	< 0.001
Duration	0.005	ns
Concentration x Duration	Ns	ns

ns *= not significant.*

respect to duration of exposure to leachate, significant increase in the mean frequency of MN was observed on day 14, and was not significantly different from that of day 21 (Figure 6). In comparison with the control, a significantly higher frequency of other NA was observed in snails exposed to leachate concentrations of 12.5%, 25% and 50%. No significant difference was observed between the control snails and those exposed to leachate concentration of 6.25% (Figure 7).

Discussion

Waste leachates constitute major source of environmental pollution and contains hazardous compounds such as organic and inorganic compounds. These toxic compounds induce physiological dysfunction and DNA damage in most biota (Alimba and Bakare, 2016), and have become a serious health issue, due to their ability to bond with DNA molecules and induce cascades of biological damages. The application

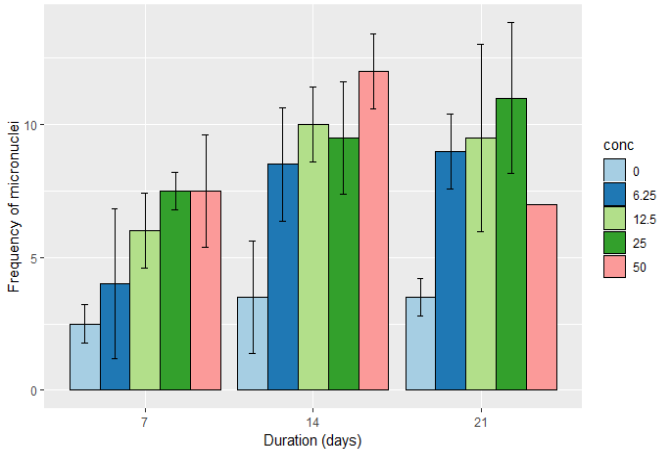


Figure 6: Mean and SE for frequency of MN in snails exposed to different concentrations of leachate, grouped by their duration of exposure.

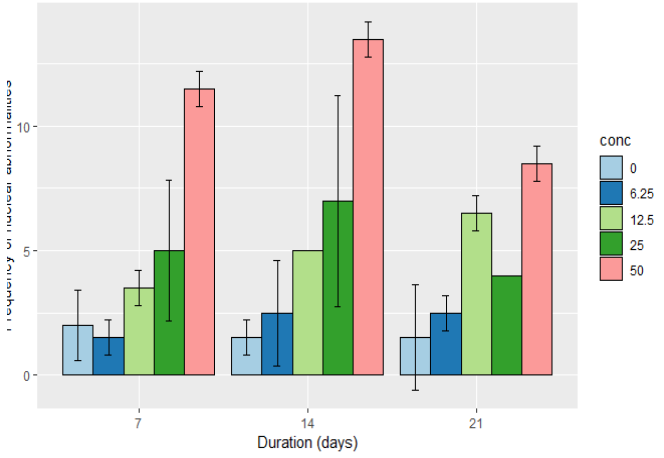


Figure 7: Mean and SE for frequency of NA in snails exposed to different concentrations of leachate, grouped by their duration of exposure.

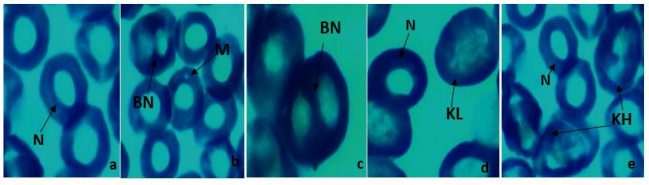


Figure 8: Hemocytes of *L. aurora* exposed to waste leachate showing, Normal hemocyte (N), micronucleated cell (M), binucleated cell (BN), Karyolytic cell (KL) and Karyorrhectic cell (KH) (×1000)

of ecologically relevant species like land snails offers a chance to perform early tests on ecosystem health in relation to exposure to these contaminants (Jha, 2004).

Oxidative stress is one of the most reported biological response observed in snails treated with several chemical compounds. Digestive glands in mollusks are known to be one of the important sites of multiple oxidative reactions and maximal free radical generation (Ali *et al*., 2012). The increase or decrease in antioxidant activity in organisms results to an oxidative stress (Ojha *et al*., 2011). Oxidative stress, therefore, occur as an imbalance in the biological oxidant to antioxidant ratio; which results to lipid, proteins, carbohydrates and nucleic acids impairment. In most cases, is the high production of reactive oxygen species (ROS), which results to severe damage to cell structure, indicative of oxidative damage (El-Demerdash, 2007). High production of ROS and its direct interaction with biological tissues are the major mechanisms exerted by pollutants in biological systems (Ma *et al*., 2013).

The elevation of the antioxidant enzymes observed in the present study

suggests that waste leachate have oxidative stress inducing effects in the exposed snails. SOD and CAT are the initial line of defense in antioxidant systems due to their significant function against oxidative stress. In this study, the significant increase in the activities of SOD and CAT observed in the digestive gland of *L. aurora* exposed to waste leachate is an indicative of cellular damage that results in release of antioxidant enzymes to inhibit the accumulation of reactive oxygen intermediates. Wu and Yi (2015) reported that exposure to pollutants increases the antioxidant enzymes like SOD and CAT to neutralize the impact of ROS. Increase in SOD and CAT activity was dose-duration dependent and was observed in snails exposed to highest concentrations (25% and 50%) of leachate over longer durations (days 14 and 21). This might have occurred to compensate for increase in ROS caused by high leachate concentrations, resulting to oxidative stress. It has been suggested that toxicants may induce different antioxidant/prooxidant responses depending on their ability to produce ROS (Barata *et al*., 2005). Similar to this study, Fahmy *et al*. (2014) reported the toxicity of zinc oxide nano-particules, which include inhibition and stimulation of both SOD and CAT activities, depending on their concentrations in tissues of freshwater snail *Biomphalaria alexandrina*. They suggested that the observed effects could be due to ROS formation and increase in antioxidant defense system dysfunction.

Lipids are one of the principal targets of oxidative stress. Lipid peroxidation results to generation of highly damaging intermediates, which consequently increase the production of ROS in biological system. Malondialdehyde (MDA) is the main biomarkers of lipid peroxidation and its quantification is a direct indicator of oxidative stress (Tao *et al*., 2013). In this study, increase in MDA concentration was observed in *L. aurora* exposed to waste leachate compared to the control. Free radicals generation by pollutants in biological system has been reported to result to increased levels in MDA (Belhaouchet *et al*., 2012). This result is comparable with the reports of Siwela *et al*. (2010) that observed high increase in MDA level in *Lymnaea natalensis*, exposed to environmental pollutants. In addition, Fahmy *et al*. (2014) recorded a significant increase in MDA level in the tissues of *biomphalaria alexandrina* exposed to zinc oxide nanoparticles. Giarratano *et al*. (2014) suggested that the increase free radical production might be associated with the high content of iron (Fe) in digestive gland tissue of snails. Through Fentontype reactions, Fe can induce the production of toxic radicals and aggravates peroxidation of lipids; therefore, the high increase of MDA content observed in this study might also be due to the high concentration of Fe in the leachate. This is in consonance with the findings of Radwan *et al*. (2010) which demonstrated positive correlation of MDA with heavy metals, and suggested that the presence of ionic metals in the digestive gland of snails catalyzes the Fenton reaction and increase the risk of cell injury.

Glutathione peroxidase (GPx) is known as the most significant peroxidase that detoxify the peroxide and hydroperoxides to water and hydroxyl compounds, respectively (Pinto *et al*., 2003) thus it constitutes an essential part of the antioxidant system. In this study, significant increases in GPx activity in *L. aurora* exposed to varying concentrations of leachate were recorded compared to the control. This might be due to the formation of free radicals in the cells, since ROS is the main substrate for GPx activation (Hermes-Lima, 2004). GPx stimulation shows dose and duration dependent of leachate exposures. This could be associated to its compensatory role in the defense system of the antioxidant mechanism as toxicant in the system increases. Ali *et al*. (2012) observed an increase GPx activity in the digestive gland of *Lymnaea luteola* and suggested the cause to be overproduction of ROS after ZnO nanoparticles exposure. The reported increase is also in consistent with the findings of El-Shenawy *et al.* (2012) who observed elevated GPx levels in snails exposed to cadmium, lead, copper and iron.

Proteins are one of the major groups of biological materials comprising the chief nitrogenous elements of the body tissues. The concentration of free amino acids in mollusk varies with pollution levels (Bishop *et al*., 1983). In this study, significant decrease in Total Protein levels was observed in snail treatment groups compared to the controls. Singh *et al*. (1996) reported that the quantity of proteins depends on the rate of synthesis or its degradation. The decrease in the reported levels of total protein may be partly resulted from imbalance between the rate of synthesis and the rate of degradation. Depletion in the concentration of protein might be due to either suppressed incorporation of protein synthesis or increased breakdown of proteins in to amino acids, which further diffused out of cells (Gaur, 2011). In addition, the harmful effect of the waste leachate could cause increase in energy utilization and damage to cell organelles of exposed snails leading to inhibition of protein synthesis (Eissa *et al*., 2002). The present study is in consonance with the observations of Radwan *et al*. (2008), that methiocarb caused significant decrease in total proteins in the tissues of *E. vermiculata*.

Micronucleus (MN) test has been a common method in environmental genotoxicity assessment. MN are formed in actively dividing cell as a result of mitotic spindle dysfunction or lagging chromosomes that failed to incorporate in the daughter nuclei during cell division (Krishna *et al*., 2000). Bakare *et al*. (2012) opined that the formation of micronucleus is an indication of DNA damage. Haemocytes are frequently used in cytogenetic evaluation due to their sensitivity to genotoxic pollutant, relatively non-invasive, easily sampled, and play significant role in immune defense and detoxification (Magni *et al*., 2006). In the present study, micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities (NA) were investigated in hemocyte of *Limicolaria aurora* exposed to different concentrations of waste leachate. The study revealed increase of micronuclei and other nuclear abnormalities on snails exposed to leachate compared to the control. This result suggested that the waste leachate contain xenobiotics, mostly toxic metals and organic compounds, which are clastogenic and or aneugenic and are capable of causing chromosomal damage in *L. aurora*. This result is in accordance with the findings of Khalil (2016) who reported increase formation of MN in land snail (*Eobania vermiculata*) exposed to sublethal doses of methomyl lannate.

Frequency of micronuclei observed in treated snails was also significantly influenced by the duration of exposure to leachate. Observed increase in MN frequencies on days 7 and 14 indicate increased genetic alterations, which might enhance cell mutation and cancer formation, and possibly, leading to decreased embryonic viability, genetic disorders and biodiversity loss of biota (Russo *et al*., 2004). These findings were in congruence with the report of Alimba and Bakare (2016) wherein they observed significant increase in MN formations in catfish, quail and rat exposed to landfill leachates.

Aside the formation of micronuclei, increased frequencies in other nuclear abnormalities in hemocytes of treated snails were observed and their presence complement the scoring of MN and further accentuate the genotoxic effects of the leachate. These nuclear abnormalities are indicators of cellular dysfunction in snail and can lead to genetic damage (Rodilla, 1993). The occurrence of binucleated cells is the result of the inhibition of cytokinesis during M phase of the cell cycle leading to the formation of a cell with two nuclei (Fenech *et al*., 2003). Ali et al. (2008) and Alimba and Bakare (2016) reported similar observations. The presence of Karyorrhectic cells might be associated with the chromatin disorder caused by xenobiotics in the waste leachate, resulting to dense network of nucleochromatin elements that lead to fragmentation and disintegration of the nucleus. Karyolytic cells appears to have no nuclei. This indicates cell injury, which are associated to the late stage of cell death process.

The main impact of oxidative stress is chromosomal damage (Radetski *et al*., 2004), and elevated levels of oxidative enzymes was earlier observed in this study. Induction of DNA damage due to oxidative stress have been reported in waste leachate exposures (Bakare *et al*., 2013). This occurrence might be due to oxidative biotransformation that produces high DNA-reactive specie (Woodhead *et al*., 1999). This postulation reinforced the reports of Bakare *et al*. (2012), wherein they showed that MN induction by landfill leachate in mouse might be due

to oxidative damage caused by chemicals present in the leachate.

Furthermore, heavy metals can form a bond with phosphate and DNA bases, interfering with protein structure and function to cause DNA damage (Resit *et al*., 1998). High concentrations of heavy metals above the standard permissible limits observed in the leachate might also be accountable for these observations. Heavy metals are known mutagenic and studies have linked the genotoxic potential of heavy metals to accumulation of free radicals and DNA damage actions in some organisms (Andreikėnaitė *et al*., 2007). In addition, the elevated levels in conductivity, TDS, COD, BOD and anions levels suggested that the waste leachate contain high proportion of inorganic pollutants, which can also contributed to the oxidative damage and genotoxic effects observed in this study.

Conclusion

In this study, observed induction of oxidative stress and genotoxicity in concentration and duration dependent manner was stimulated by the sampled waste leachate in *L. aurora*. The genotoxic effect observed was likely induced through the production of reactive oxygen species (ROS) which also resulted in oxidative stress. This reinforced that waste leachate consists of hazardous compounds capable of posing a public health risk to the environment, surrounding biota and humans included. This study also demonstrate the sensitivity of giant African land snail to environmental pollutants and therefore, recommends its use in environmental monitoring studies.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical support of Dr. Oguejiofor of Faculty of Veterinary Medicine, University of Nigeria, Nsukka.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

Reference

1. Adetoro FA, Ikuabe B O, Lawal R A. Toxicological Response of *Poecilia reticulata*, *Hyla* species and *Culex* species to Leachates from Olusosun Landfill, Lagos State, Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 2018; 22(5): 817 – 823.
2. Ali D, Alarifi S, Kumar S, Ahamed M, Siddiqui M. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteolaL*. *Aquat. Toxicol.* 2012; 124: 83–90.
3. Ali F, El-Shehawi A M, Seehy M A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *Afr. J. Biotechnol*. 2008; 7: 606-612.
4. Alimba CG, Bakare AA. In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. *Ecotoxicol.* 2016; 25:310–319.
5. Andreikėnaitė L, Baršienė J, Vosylienė MZ. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalitiers in blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with heavy metal mixture and road maintenence salts. *Acta Zoologica Lituanica*. 2007; 17(3): 213–219.
6. Anim AK, Ackah M, Fianko JR, Kpattah L, Osei J, Serfor- Armah Y, Gyamfi ET. Trace elements composition of *Achatina achatina* samples from the Madina Market in Accra, Ghana. *Res. J. Environ Earth Sci.* 2011; 3:564–570.
7. APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2012; 22nd ed. Washington DC., USA.
8. Bakare AA, Alabi OA, Gbadebo AM, Ogunsuyi OI, Alimba. In vivo cytogenotoxicity and oxidative stress induced by electronic waste leachate and contaminated well water. *Challen.* 2013; 4:169–187.
9. Bakare AA, Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, Dhawan A. DNA and oxidative damage induced in somatic organs and tissues of mouse by municipal sludge leachate. *Toxicol IndHealth*. 2012; 28:614–623.
10. Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Toxicol. Comp. Biochem. Physiol.C.* 2005; 140: 175–186.
11. Belhaouchet N, Djebar MR, Meksem L, Grara N, Zeriri I, Berrebbah H. Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide. The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. *J. Appl. Sci. Res.* 2012; 8: 4199-4206.
12. Bishop SH, Ellis LL, Burcham JM. Amino acid metabolism in molluscs. In the *Mollusca. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*. Academic Press, New York, USA. 1983; 1: 243-327.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Ann. Biochem*. 1976; 72:248–254.
14. Ebenso IE. Molluscicidal effects of neem *Azadirachta indica* extract on edible tropical land snails. *Pest Manag. Sci.* 2004a; 60(2): 178 – 182.
15. Ebenso IE, Chukwu S, Udo S, Ukpai CU, Udo MT, Umanah U, Isang A, Akam A. Some behavioural responses of *Limicolaria aurora* exposed to gramoxone. *Nigerian J. Physiol. Sci.* 2004b; 19(1-2): 82 – 85
16. Ebenso IE, Ita B, Umoren EP, Ita M, Binang W, Edet G, Izah M, Udo IO, Ibanga G, Ukpong EE. Effect of carbamate molluscicide on African giant land snail Limicolaria aurora. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* 2005; 9(1): 99 - 102
17. Eissa SH, Rizk ET, Abou-Shafey AE, Mona MH, Atlum A. Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on heamocytes of the fresh water snails, *Biomphalaria alexandrina* and *Lanistes carinatus*. *Proc LCBS* 2002; 2: 417-447.
18. El-Demerdash FM. Lambda-cyhalothrininduced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidant. *Toxicology in Vitro*. 2007; 21: 392-397.
19. El-Moshaty FI, Pike SM, Novacky AJ, Sehgal OP. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 1993; 43:109-119.
20. El-Shenawy N, Amaal M. Using Enzymatic and Nonenzyamatic Antioxidant Defense Systems of the Land Snail Eobonia vermiculata as Biomarkers of Terrestrial Heavy Metal Pollution. *Ecotoxicol. Environmen. Saf.* 2012; 84: 347-354. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.014
21. Fahmy SR, Abdel-Ghaffar F, Bakry FA, Sayed DA. Ecotoxocological Effect of Sublethal E xposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Freshwater Snail *Biomphalaria alexandrina*. *Arch Environ ContamToxicol*. 2014; 67(2): 192-202.
22. Fenech M, Chang WP, Krisch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinens is-block micronucleus as say using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 2003; 534: 65-75.
23. Gaur A. Behavioral and biochemical alteration in apple snail, *Pila globosa* exposed to Dithane M-45. Ph. D. Thesis. The M.J.P. Rohilkhand University, Bareily. 2011.
24. Ghosh P, Thakur IS, Kaushik A. Bioassays for toxicological risk

assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicol.Environ. Saf.* 2017; 141: 259–270.

25. Giarratano E, Mónica N, Gil GM. Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel Aulacomya atra atra (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). . *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014; 107: 111-119.

26. Gupta P, Arpit B, Roshani K, Lalit L, Rajnarayan T, Pushpendra KG, Neha B, Ravindra S, Pradyumna KM. Impairment of Mitochondrial-Nuclear Cross Talk in Lymphocytes Exposed to Landfill Leachate. *Environ. H Insi*. 2019; 13: 1–11.

27. Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, New Jersey, Wiley–Liss, 2004; 319-351.

28. Jha AN. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat Res*. 2004; 552: 1–17.

29. Khalil MA. Impact of methomyl lannate on physiological parameters of the land snail *Eobania vermiculata*. *J. Basic Appl. Zool.* 2016; 74: 1–7.

30. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, *Mutat. Res.* 2000; 455: 155–166.

31. Li G, Chen J, Yan W, Sang N. A comparison of the toxicity of landfill leachate exposure at the seed soaking and germination stages *on Zea mays L*. (maize). *J. Environ. Sci.* 2017; 55: 206–213.

32. Livingstone DR, Lips F, Martinez PG, Pipe RK. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol*. 1992; 112: 265–276.

33. Ma H, Diamond SA. Phototoxicity of TiO2 nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) is dependent on life stage. *Environ. Toxicol. Chem.* 2013; 32: 2139–2143.

34. Magni P, De Falco G, Falugi C, Franzoni M, Monteverde M, Perrone E, Sgro M, Bolognesi C. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environ. Pol.* 2006; 142: 65–72.

35. Ojha A, Yaduvanshi SK, Sivastava N. Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticide on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide Biochem Physiol*. 2011; 99:148-156.

36. Pinto E, Sigaud-Kutner TC, Leitao MA, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol*. 2003; 39: 1008–1018.

37. Radetski CM, Ferrari B, Cotelle S, Masfaraud JF, Ferard JF. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci Total Environ.* 2004; 333: 209–216.

38. Radwan MA, Gendy KS, Gad AF. Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of Theba pisana exposed to heavy metals. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010; 58(3): 828-835.

39. Radwan MA, Essawy ssawy AE, Abdelmeguied NE, Hamed SS, Ahmed AE. Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticide Biochem. Phys.* 2008; 90 (3): 154-167.

40. Resit M, Jenner P, Halliwell B. Sulphite enhances peroxynitrite dependent a1-antiproteinase inactivation: a mechanism of lung injury by sulphur dioxide. *FEBS letter*. 1998; 43: 231-234.

41. Rodilla V. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cell with micronuclei in cisplatin Treated CHO cultures. *Mutat. Res.* 1993; 300: 281–291.

42. Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol.Environ. Saf.* 2004; 57(2): 168–174.

43. Singh NN, Das VK, Singh S. Effect of aldrine on carbohydrate, protein and ionic metabolism of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Bull. Of Environ. Conta. And Toxicol*. 1996; 57: 204-210.

44. Siwela AH, Nyathi CB, Naik YS. A comparison of metal levels and antioxidant enzymes in freshwater snails, *Lymnaea natalensis*, exposed to sediment and water collected from Wright Dam and Lower Mguza Dam, Bulawayo, Zimbabwe, *Ecotox. Environ. Saf.* 2010; 73: 1728-32.

45. Sminia T, Barendsen L.A. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncates*. *J. MorphoL*. 1980; 165: 31-39.

46. Tao Y, Pan L, Zhang H, Tian S. Assessment of the toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in clams *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013; 93: 22-30.

47. Tsarpali V, Kamilari M, Dailianis S. Seasonal alterations of landfill leachate composition and toxic potency in semi-arid regions. *J. Hazard. Mater*. 2012; 233–234: 163–171.

48. United States Environmental Protection Agency. Acid digestion of sediments sludges and soils, Method-3050B.USEPA: Washington, DC. 1996.

49. Vega IA, Arribére MA, Almonacid AV, Ribeiro GS, Castro-Vazquez A. Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* 2012; 19: 3307.

50. Villela IV, Oliveira IM, Silveira JC, Dias JF, Henriques JA, Silva J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions, *Mutat. Res.* 2007; 628: 76–86.

51. Wu G, Yi Y. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comp. Biochem. Physio.* Part C. 2015; 167: 131-139.

52. Zhang Y, Song J, Yuan H, Xu Y, He Z, Duan L. Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmental relevant concentration of lead, mercury, cooper. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 2010; 30: 19–25.

53. Zhao R, Xi B, Liu Y, Su J, Liu S. Economic potential of leachate evaporation by using landfill gas: A system dynamics approach. *Resour.Conser.Recycl.* 2017; 124: 74–84.

54. Zhu HH, Huang JR, Mazella J, Rosenberg M, Tseng L. Differential effects of progestin and relaxin on the synthesis and secretion of immunoreactive prolactin in long term culture of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1990; 71: 889–899.

55. Zin M, Shaylinda N, Abdul Aziz H, Adlan M, Ariffin A. Characterization of leachate at Matang Landfill site, Perak, Malaysia. *Acad. J. Sci.* 2012. 1(2): 317-322.

Investigación toxicológica en suicidios a partir de las muestras recibidas en el Servicio de Toxicología Forense de la Universidad de Santiago de Compostela en el periodo 2009-2018

Álvarez-Freire I, Cabarcos Fernández P, Regenjo Vázquez M, Tabernero Duque MJ, Bermejo Barrera AM

Servicio de Toxicología Forense. Instituto de Ciencias Forenses. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela C/ San Francisco s/n 15782 Santiago de Compostela España

Resumen: Los suicidios son la principal causa de muerte violenta en España, muy por delante de los accidentes de tráfico. Los medios más comúnmente utilizados para ello son la ahorcadura, precipitación, sumersión y las intoxicaciones. En el Laboratorio de Toxicología Forense del Instituto de Ciencias Forenses de la Universidad de Santiago de Compostela, se reciben las muestras judiciales de parte de los fallecidos en la Comunidad Autónoma de Galicia, entre los que se encuentra un gran número de suicidios. En este trabajo se recopilan los datos disponibles de los casos de suicidio recibidos, durante el período 2009-2018. Se han analizado 1177 casos, encontrándose que el método más frecuente de suicidio es el ahorcamiento, tanto en hombres como en mujeres, seguido de la precipitación. El número de casos de suicidio de hombres recibidos triplica al de mujeres en el total de casos recibidos. Alrededor de un 50% de los casos fueron positivos a alguna sustancia tóxica. En más del 20% la determinación de alcohol etílico en sangre resultó positiva siendo más frecuente en hombres que en mujeres. La presencia de drogas y medicamentos se confirmó en más del 30 % de los casos y para estas sustancias son las mujeres el grupo predominante.

Palabras Clave: Suicidio; Investigación Toxicológica; Galicia

Introducción

El suicidio es la acción de quitarse la vida de forma voluntaria y premeditada. Cada año mueren en el mundo cerca de 800.000 personas por suicidio, más que por accidentes de tráfico o conflictos bélicos (OMS, 2019). Se estima que, por cada suicidio llevado a cabo con éxito, se cometen 20 que no fructifican pero que acarrean consecuencias como lesiones graves, hospitalizaciones y secuelas emocionales, tanto para el suicida como para sus allegados. El suicidio es un problema multifactorial y que ofrece diferentes facetas de aproximación, tanto epidemiológicas y de salud pública, como desde el punto de vista clínico-psiquiátrico y toxicológico.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolla la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE, 2019). En el capítulo 20 de la misma, se encuentran las autolesiones intencionales designadas por los códigos del X60 al X84:

Envenenamiento autoinfligido intencionalmente por, y exposición a:

Analgésicos, drogas, narcóticos, medicamentos y otras sustancias (X60-X64); al alcohol (X65); disolventes orgánicos e hidrocarburos halogenados y sus vapores (X66); otros gases y vapores (X67); plaguicidas (X68); otros productos químicos y sustancias nocivas, y los no especificados(X69)

Lesión autoinfligida intencionalmente por:

Ahorcamiento, estrangulamiento o sofocación (X70); ahogamiento y sumersión (X71); disparo de armas de fuego (X72-X74); material explosivo (X75); humo, fuego y llamas (X76); vapor de agua, vapores y objetos calientes (X77); objeto cortante (X78); objeto romo o sin filo (X79); al saltar desde un lugar elevado (X80); por arrojarse o colocarse delante de objeto en movimiento (X81); por colisión de vehículo de motor (X82); por otros medios especificados (X83); por medios no especificados (X84)

Los análisis toxicológicos juegan un papel esencial en la investigación de prácticamente todos los casos forenses, siendo un componente integral de la investigación del suicidio. Los hallazgos detectados durante los exámenes toxicológicos pueden arrojar luz sobre la causa y la forma de la muerte. Los resultados toxicológicos pueden revelar la falta de medicación, o el incumplimiento de tratamiento, en un individuo afectado con trastorno psiquiátrico como la depresión. También pueden revelar la presencia de etanol u otra sustancia potencialmente tóxica en un suicida.

Actualmente, existen muy pocos trabajos publicados sobre los suicidios desde el punto de vista toxicológico (Shields et al., 2006) (Shane Darke, 2009), y ninguno en Galicia hasta la fecha. Este trabajo comprende 10 años (2009-2018) y repasa los hallazgos toxicológicos de los casos de suicidio analizados en el Instituto de Ciencias Forenses de la Universidad de Santiago de Compostela, provenientes de la Comunidad Autónoma de Galicia.

Material y Métodos

Se ha realizado una revisión retrospectiva de 10 años de los casos de suicidio, cuyas muestras biológicas fueron enviadas al Laboratorio de Toxicología Forense. Los datos analizados son: el género, la edad, la procedencia geográfica de cada caso, el método de suicidio, así como los resultados toxicológicos.

Los análisis toxicológicos se realizan principalmente en sangre y orina. Cuando el médico forense lo solicita, se analizan otras muestras como bilis, contenido gástrico y humor vítreo. De forma general, se realiza en primer lugar un screening en orina (si está disponible) mediante un inmunoensayo, seguido de la confirmación y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) o cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de red de diodos (HPLC-PDA). El análisis de etanol se realiza mediante cromatografía de gases y detección de ionización de llama (CG-FID) y tanto el monóxido de carbono (carboxihemoglobina) como el cianuro se determinan por espectrofotometría ultravioleta-visible.

Resultados

Incidencia de los suicidios

Se analizaron un total de 1177 casos. En la Figura 1 se muestran el total de casos de suicidio en España (INE, 2019) distribuidos por año, el número total en Galicia (IMELGA, 2019) (representan un 9,08% del total de España) y el número de casos recibidos en nuestro laboratorio (36.51% del total de suicidios en Galicia).

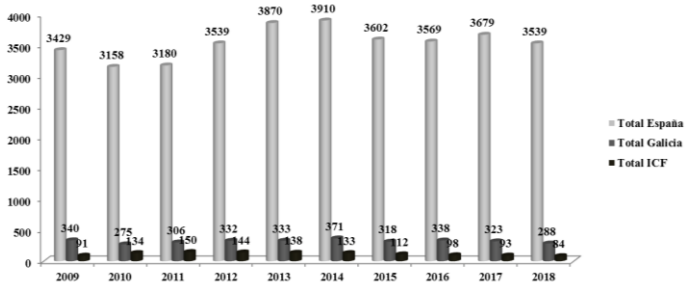


Figura 1: Total de casos de suicidio en España, Galicia e Instituto de Ciencias Forenses (USC) (Fuente INE, 2019)

*e-mail: *ivan.alvarez@usc.es*

Analizando los casos por provincias, se observa que A Coruña es la que mayor número de suicidios registra seguida de Pontevedra (Tabla 1). Cabe señalar que son las dos provincias con mayor población de Galicia. Si los casos son referidos a 100.000 habitantes, Lugo y Ourense son las provincias con mayor incidencia. En la Figura 2 se refleja esta incidencia por provincia y 100.000 habitantes para el año 2018 (IMELGA, 2019).

Tabla 1. *Número de casos de suicidio por provincia y año (Fuente: IMELGA, 2019)*

	A Coruña	Lugo	Ourense	Pontevedra
2012	177	55	44	88
2013	140	52	48	107
2014	181	60	31	122
2015	153	58	31	82
2016	179	33	35	98
2017	149	44	46	85
2018	129	47	40	72

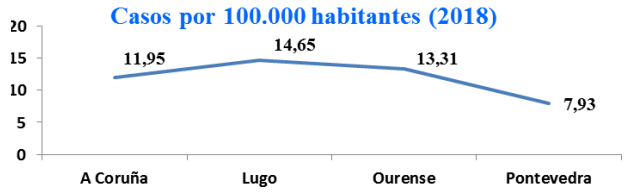


Figura 2: Suicidios por 100.000 habitantes en el Año 2018 (Fuente: IMELGA, 2019)

El Instituto de Medicina Legal de Galicia (IMELGA) integra a los médicos forenses de Galicia. Posee 7 subdirecciones en Galicia: Santiago, A Coruña, Ferrol, Lugo, Ourense, Pontevedra y Vigo. En la Figura 3 se muestran los casos recibidos de cada subdirección en el período objeto de estudio. Algunas subdirecciones envían sus muestras al Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses en Madrid de ahí el bajo número de muestras recibidas de las mismas.

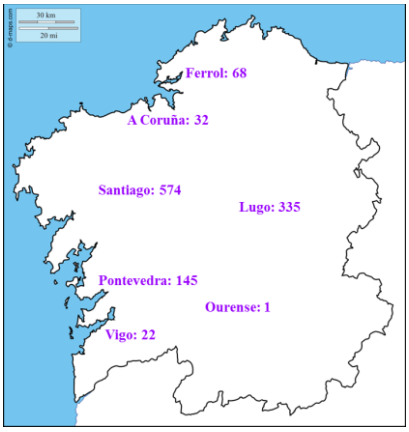


Figura 3: Número de casos recibidos de cada subdirección del IMELGA.

Género y edad de las víctimas

En nuestro estudio la distribución por género muestra que, de los 1177 casos, 879 correspondieron a hombres mientras que 298 fueron mujeres. Éstas por tanto representaron un 25 % del total de la población estudiada. En la Figura 4 se muestra la distribución de los casos por género y año.

En cuanto a las edades, la franja que comprende entre 45 y 64 años es la que más casos de suicidio abarca, tanto en hombres como en mujeres (Tabla 2).

Tabla 2. *Distribución de los casos de suicidio estudiados por edades.*

Edad	<15	15-44	45-64	65-74	<74	desconocida
Hombres	0	237	340	107	176	19
Mujeres	0	71	108	45	70	4

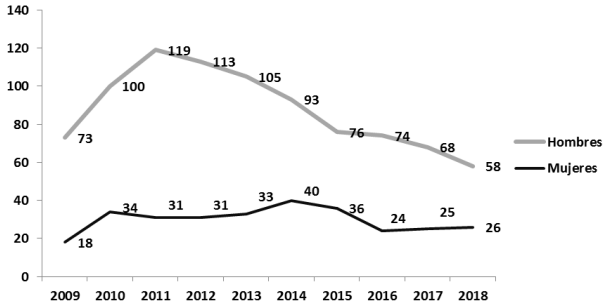


Figura 4: Evolución de los suicidios en Galicia por género en los años estudiados.

Método de suicidio

En cuanto al método de suicidio empleado, los datos muestran que el mayoritario es la ahorcadura, utilizada en un 68,1% de los casos por hombres y en un 48,8 % por mujeres. A continuación, por número de casos sería la precipitación el método elegido con un 8,37% en hombres y un 16,72 % en mujeres. En tercer lugar, aparecen en nuestro medio la sumersión y la intoxicación para el caso de los hombres (con el mismo número de casos, 66 casos, 7,47%) mientras que en las mujeres el tercer lugar se le asigna a la intoxicación con un 12,97%. En la Tabla 3 se muestran los datos según el método de suicidio escogido en hombres y en mujeres.

Tabla 3. *Casos según el método de suicidio empleado en hombres y mujeres.*

	Hombres	Mujeres
Ahorcadura	602	144
Precipitación	73	49
Sumersión	66	37
Intoxicación	66	47
Atropello Tren	21	8
Arma Fuego	39	3
Otros	12	10

Resultados de la investigación toxicológica

Todos los casos de suicidio incluidos en este estudio fueron analizados en el laboratorio de Toxicología. La investigación toxicológica de las muestras recibidas muestra resultados positivos a alguna sustancia en un 30-40 % de los casos, porcentaje que aumenta un poco en los casos de atropello por tren.

El alcohol etílico fue positivo en sangre en un 23,5 % de los hombres y en un 14,7 % de las mujeres (Figura 5). En cuanto a los psicofármacos y drogas de abuso se encontró un mayor porcentaje de positivos en mujeres, 43%, mientras que en los hombres fue del 26,7% (Figura 6)

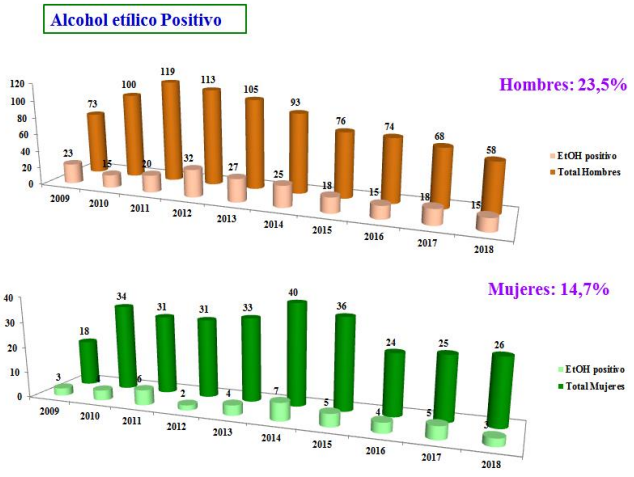


Figura 5: Número de casos positivos a alcohol etílico por sexo y porcentajes.

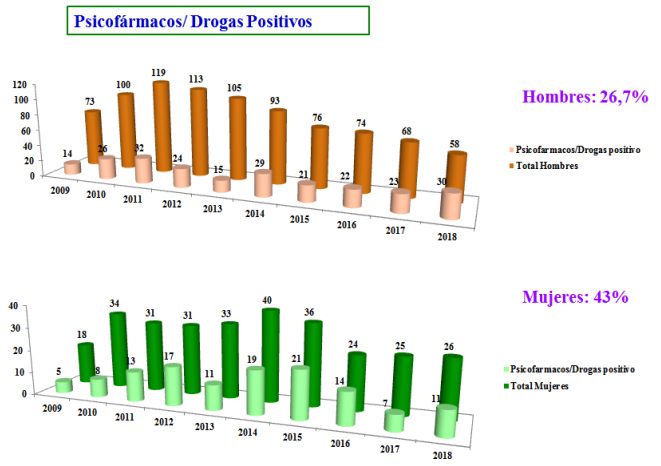


Figura 6: Número de casos positivos a psicofármacos/drogas de abuso por sexo y porcentajes.

En la Figura 7 se muestran desglosados por familias todas las sustancias encontradas en los casos estudiados. En ella queda reflejado que las sustancias más frecuentemente encontradas son el etanol y las benzodiacepinas en hombres y las benzodiacepinas y los antidepresivos en mujeres. Otro dato significativo lo aportan las Tablas 4 y 5 donde se muestran los 4 tipos de sustancias más frecuentemente encontradas, desglosadas por edades.

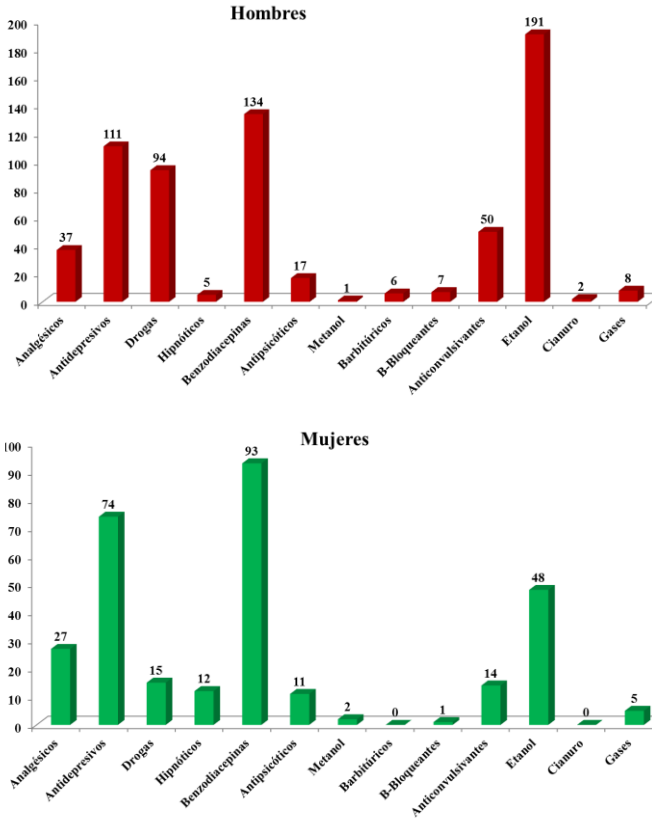


Figura 7: Sustancias tóxicas encontradas en los casos estudiados (hombres arriba, mujeres abajo)

En cuanto a los suicidios por intoxicación, las sustancias más frecuentemente encontradas fueron los antidepresivos (21%), las drogas de abuso (16%), las benzodiacepinas (10,5%) seguidas muy de cerca por los analgésicos (9,5%) y los antipsicóticos (8,6%) (Figura 8)

Discusion

Tabla 4. *Sustancias tóxicas más frecuentemente encontradas en hombres desglosadas por edades.*

Hombres	Edad	15-44	45-64	65-74	<74	desconocida
Antidepresivos		36	53	12	5	5
Drogas		63	26	1	1	3
Benzodiacepinas		41	67	13	7	6
Etanol		67	109	0	10	5

Tabla 5. *Sustancias tóxicas más frecuentemente encontradas en mujeres desglosadas por edades.*

Mujeres	Edad	15-44	45-64	65-74	<74	desconocida
Antidepresivos		22	36	8	8	0
Drogas		10	4	0	0	1
Benzodiacepinas		28	39	12	11	3
Etanol		13	29	3	2	1

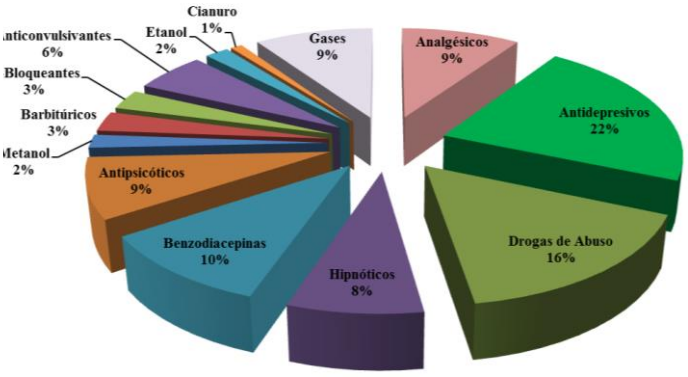


Figura 8: Número de casos positivos a psicofármacos/drogas de abuso por sexo y porcentajes.

El suicidio es un fenómeno multicausal, por lo tanto, su terapia y prevención son complejas y deben tomarse en consideración las diferencias de género y estrato social al desarrollar estrategias preventivas (Kanchan y Menezes, 2008) (Kanchan y Menezes, 2008). Si bien los grupos en riesgo en general se pueden identificar, la predicción del suicidio de manera individual es difícil porque los factores de riesgo de cada sujeto representan una pequeña proporción de la varianza del riesgo y carecen de suficiente especificidad, lo que resulta en altas tasas de falsos positivos (Oquendo et al., 2006).

En general las razones invocadas para el suicidio difieren sensiblemente según el sexo del suicida. Por lo tanto, las campañas de prevención, recomendaciones y guías clínicas deberían tener muy en cuenta este fenómeno y hacer una distinción en sus objetivos. Para las mujeres, las principales razones que se mencionan son de orden de salud psíquica y física mientras que, para los hombres, si bien la depresión es la primera razón nombrada, las de orden afectivo y financiero están en la segunda y tercera posición (Villettaz, 2007).

Para que podamos llegar a conclusiones realmente significativas es fundamental registrar de manera exhaustiva y detallada los tipos y la evolución de los tóxicos empleados, porque muchas veces en los casos de autolesión no hay un criterio claro por parte de todas las instituciones, lo cual conlleva una gran pérdida de información y hace más difícil su acceso y consecuentemente, su análisis. Con respecto a la falta de información y la falla en su recopilación se realizó un estudio en Tarragona, entre 2004 y 2012 con el objetivo de evaluar el impacto de la pérdida de información sobre las estadísticas oficiales de suicidio y poner de relieve la importancia de la información de origen forense. Se concluyó que la recuperación de datos en las muertes por suicidio a partir de las fuentes de datos forenses mejora la información estadística, corrige su infradeclaración y amplía el conocimiento sobre el método

de suicidio y las características personales de los implicados (Eneko Barbería et al., 2018). Además, Giner y Guija (Giner y Guija, 2014) en 2014, propusieron una posible solución a este problema: que el encargado de cumplimentar los datos de muerte con intervención judicial fuese el mismo médico forense que realiza el informe de autopsia y que remite al Juzgado de Instrucción. Esta medida no se ha implementado y el error de registro continúa, lo que supone una limitación en los trabajos de investigación epidemiológica sobre muerte violenta realizados en nuestro país (Santurtún, 2016).

El presente estudio proporciona una valiosa información acerca de los métodos, sexo, edades y los tóxicos empleados a la hora de cometer suicidio en la Comunidad Autónoma de Galicia.

La elección del método suicida se puede tomar como un espejo de la sociedad en la que ocurre. A rasgos generales en Estados Unidos lo más común es el uso de armas de fuego, mientras que en Europa el ahorcamiento es más frecuente, prevaleciendo el uso de agroquímicos en el caso de Asia (Gunnell et al., 2007).

Las sustancias más frecuentemente encontradas son el etanol y las benzodiacepinas. Es bien sabido que el etanol es una de las sustancias psicoactivas más detectadas en el análisis postmortem en todo el mundo y está demostrado que facilita la conducta suicida en sujetos predispuestos (Kordrostami R, 2017). Las benzodiacepinas han sustituido a los barbitúricos, un grupo de fármacos históricamente muy utilizado para cometer suicidio. Tienen una toxicidad menor comparado con los barbitúricos (Handley SA, 2014), lo que ha propiciado la disminución de muertes a lo largo de los años. De todas formas, siguen siendo unos fármacos muy habituales, especialmente en países del primer mundo donde el uso de este tipo de fármacos es más usual y son relativamente fáciles de conseguir, más teniendo en cuenta que un gran porcentaje de suicidas tienen algún tipo de problema psiquiátrico (Villettaz, 2007). En muchas ocasiones se ingieren junto con alcohol y/u otras drogas, lo que aumenta su toxicidad. También están muy presentes los antidepresivos, ya que son cada vez más recetados, no sólo por los psiquiatras, sino también por los médicos de atención primaria. Es interesante mencionar que en los últimos años algunas agencias reguladoras han emitido advertencias sobre el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. Estos fármacos aumentan el riesgo de manera moderada, pero significativa de ideación suicida o intentos de suicidio no fatales en niños y adolescentes (Whittington et al., 2004). En los siguientes años esperamos que este debate siga en curso mientras no tengamos del todo claro la relación entre los antidepresivos y el riesgo de comportamiento suicida (Gibbons et al., 2005)

La crisis económica que afectó a España a partir del año 2008 se dejó notar también en el número de suicidios, pasando de 3158 en 2010 a 3910 en 2014 en toda España. Ese aumento se ve reflejado en la figura 4, encontrando un máximo de casos en el año 2011 en los hombres y en 2014 en las mujeres, aunque en el año 2014 es donde se observa un aumento en la tasa de suicidios en la mayor parte de las comunidades autónomas españolas. En los años en estudio las tasas brutas de mortalidad por 100000 habitantes en las diferentes comunidades autónomas reflejan diferencias apreciables. Así mientras en el comienzo del estudio, en el año 2009, Galicia ocupaba el primer puesto en tasa bruta de mortalidad por suicidio (12,28), seguida por Asturias (10,87) y las Islas Baleares (9,65), en el año 2017 la tasa más alta se encontró en Asturias (13,01) ocupando Galicia el segundo lugar (11,95) y las Islas Canarias el tercero con una tasa de 9,25. El estudio de tasas de suicidio refleja que en los años en estudio, Asturias, Canarias y Madrid son las que sufren un mayor aumento en el número de casos mientras que la tendencia en Galicia es casi homogénea, exceptuando el aumento en el año 2014 (13,54) (Portal Estadístico. Ministerio de Sanidad, 2020)

Aunque los intentos de suicidio son más comunes en mujeres que en hombres, en general la mortalidad es mayor en el sexo masculino (Ruiz-Pérez I, 2006) (Peiris-John R, 2014). La razón media mundial es de 2,8 a 1 (Brockington, 2001). En Galicia, unas de las comunidades con tasa de suicidios más altas de España, en 2018 el 70,07 % de las víctimas fueron hombres (INE, 2020). En nuestro estudio se observa que de los casos recibidos un 74,55% de los fallecidos son varones. Esta cifra se encuentra en sintonía con los datos generales de suicidios a nivel mundial, donde las tasas son tres veces mayores en hombres que en mujeres. Si evaluamos los suicidios cometidos en los diferentes grupos de edades, la categoría de 45-64 años es la que posee mayor riesgo de suicidio tanto en hombres como en mujeres.

Este estudio recoge los casos recibidos en el Servicio de Toxicología Forense de la Universidad de Santiago de Compostela, que, aunque no son todos los casos de la Comunidad Autónoma de Galicia, reflejan una tendencia similar a los datos publicados a nivel nacional.

Bibliografía

1. Brockington, L. (2001). Suicide in women. *Int Clin Psychopharmacol 16 Suppl 2*, S7-19.
2. *CIE*. (2019). Recuperado el 10 de Julio de 2019, de Organizacion Mundial de la Salud: https://www.who.int/classifications/icd/en/
3. Eneko Barbería, R. g.-S. (2018). Mejora de la estadística de mortalidad por suicidio en Tarragona (Cataluña, España) entre 2004 y 2012. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental, 11*(4).
4. Gibbons RD, H. K. (2005). The Relationship Between Antidepressant Medication Use and Rate of Suicide. *Arch Gen Psychiatry 62 (2)*, 165.
5. Giner L, G. J. (2014). Number of suicides in Spain: Differences between data from the Spanish Statistical Office and the Institutes of Legal Medicine. *Rev Psiquiatr y Salud Ment (English Ed.)*, 139-146.
6. Gunnell D, F. R. (2007). The impact of pesticide regulations on suicide in Sri Lanka. (36 (6): 1235-1242).
7. Handley SA, F. R. (2014). Drugs and other chemicals involved in fatal poisoning in England and Wales during 2000-2011. *Clin Toxicol.52 (1)*, 1-12.
8. *IMELGA*. (2019). Recuperado el 28 de 8 de 2019, de Instituto de Medicina Legal de Galicia: https://cpapx.xunta.gal/instituto-de-medicina-legal-de-galicia1
9. *INE*. (2019). Recuperado el 17 de 12 de 2019, de Instituto Nacional de Estadística: https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=7947
10. INE. (2020). *Instituto Nacional de Estadística*. Recuperado el 23 de 1 de 2020, de https://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t15/p417/a2018/l0/&file=02013.px
11. Kanchan T, M. R. (2008). Suicidal hanging in Manipal, South India - Victim profile and gender differences. *J Forensic Leg Med 15 (8)*, 493-496.
12. Kanchan T, M. R. (2008). Suicidal poisoning in Southern India: Gender differences. *J. Forensic Leg Med.15*, 7-14.
13. Kordrostami R, A. M. (2017). Forensic toxicology analysis of selfpoisoning. *DARU J Pharm Sci. 25*, 1-10.
14. OMS, O. M. (2019). Recuperado el 9 de Julio de 2019, de https://www.who.int/mental_health/prevention/suicide/estimates/en/
15. Oquendo MA, C. D. (2006). Prospective studies of suicidal behavior in major depressive and bipolar disorders: What is the evidence for predictive risk factors? *Acta Psychiatr Scand.114 (3)*, 151-158.
16. Peiris-John R, K. B. (2014). Fatalities and hospitalisations due to acute poisoning among New Zealand adults. *Intern Med J. 44 (3)*, 273-281.

17. Portal Estadístico. Ministerio de Sanidad, C. y. (3 de Febrero de 2020). *Ministerio de Sanidad*. Obtenido de https://pestadistico.inteligenciadegestion.mscbs.es/publicoSNS/Comun/Informe.aspx?IdNodo=5005

18. Ruiz-Pérez I, d. L.-L. (2006). El suicidio en la España de hoy. *Gac Sanit 20 (supl 1)*, 25-31.

19. Santurtún, M. ,. (2016). Método empleado en las muertes por suicidio en España: envenenamiento y agentes violentos no tóxicos. *Cuad Med Forense 22*, 73-80.

20. Shane Darke, J. D. (2009). Toxicology and Circumstances of Completed Suicide by Means Other than Overdose. *J Forensic Sci, 54*(2), 490-494.

21. Shields Lisa B E, H. D. (2006). Toxicology findings in Suicide. A 10-Year Retrospective Review of Kentucky Medical Examiner Cases. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 27*(2), 106-112.

22. Villettaz, P. (2007). El Suicidio En Suiza. *Justicia Juris 7*, 47-53.

23. Whittington CJ, K. T. (2004). Selective serotonin reuptake inhibitors in. *Lancet 363(9418)*, 1341-1345.

Catinonas sintéticas: una revisión del panorama actual y las estrategias de detección analítica

Lugo-Vargas AF[1], Chaves-Silva DC[1], Quevedo-Buitrago WG[1], Martínez-Suárez JF[2]*

[1]Grupo de Investigación en Sustancias Psicoactivas, Programa de Maestría en Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
[2]Grupo de Investigación en Productos Naturales Amazónicos, Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de la Amazonia, Calle 17 Diagonal 17 con Carrera 3F, Florencia, Caquetá, Colombia

Resumen: Las catinonas sintéticas forman parte de las denominadas "Nuevas Sustancias Psicoactivas (NSP)" y representan un gran problema debido al aumento progresivo de su popularidad en el mercado de las drogas de abuso, representando un reto para el campo de la toxicología. La detección analítica de estas sustancias presenta grandes inconvenientes, principalmente por la gran variedad estructural y la complejidad de la matriz de análisis, estos factores deben ser abarcados, por lo que se requieren avances en la detección analítica de estas sustancias, que respondan a la situación actual. En el presente informe se hace una revisión que permite recopilar información acerca de la química y la toxicología de las catinonas sintéticas, el estado actual en términos de regulación y consumo en el panorama nacional (Colombia) e internacional, las tendencias actuales en la detección analítica de estas sustancias y los avances recientes en la detección electroquímica.

Palabras clave: Narcóticos; Análisis Químico; Drogas de calle; electroquímica; drogas de diseño.

Abstract: ***Synthetic cathinones: a review of the current landscape and analytical detection strategies.*** Synthetic cathinones are part of the so-called "New Psychoactive Substances (NPS)" and represent a major problem due to the progressive increase in their popularity in the market for drugs of abuse, representing a challenge for the field of toxicology. The analytical detection of these substances presents major drawbacks, mainly due to the great structural variety and complexity of the analysis matrix, these factors must be covered, which is why advances in the analytical detection of these substances are required, which respond to the current situation. In this report, a review is made that allows information on the chemistry and toxicology of synthetic cathinones, the current status in terms of regulation and consumption in the national (Colombia) and international scene, current trends in analytical detection of these substances and recent advances in electrochemical detection**.**

Keywords: Narcotics; Chemical Analysis; Street drugs; electrochemistry; designer drugs.

Introducción

Las catinonas sintéticas son derivados obtenidos mediante síntesis química que le deben su nombre a la molécula de origen natural "catinona". La catinona es el principal alcaloide encontrado en las hojas de *Khat* (*Catha edulis)*, una planta perenne autóctona de Etiopía, que también se cultiva en el este de África y en el sur-oeste de la Península Arábiga, sitios donde se mastican sus hojas por tradición socio-cultural y religiosa, o se preparan en forma de té para obtener de ellas el efecto estimulante (João *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2017). La planta de *Khat* fue identificada por primera vez entre 1761 y 1763 por el botánico sueco Peter Forskal, sin embargo, no fue hasta 1930 cuando se identificó la primera molécula con el potencial estimulante de la planta: la (+)-norpseudoefedrina (Catina), a la cual se consideraba el principal componente activo de la planta hasta que en 1975 se aisló la catinona, un beta-ceto análogo de la anfetamina, en el laboratorio de estupefacientes de las Naciones Unidas. Dicha molécula mostró ser de 7 a 10 veces más potente que la catina, pero mostró ser susceptible a la degradación, generando una pérdida de sus efectos tiempo después de cortada la planta, por lo que su consumo debía provenir de hojas frescas (Coppola & Mondola, 2012; João *et al.*, 2014).

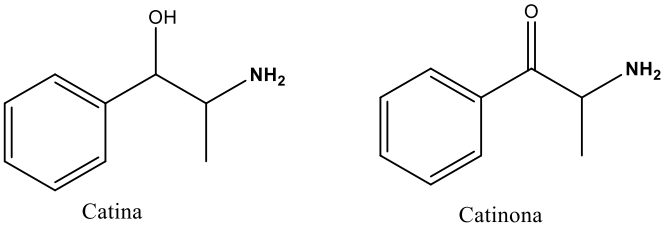


Figura 1: Principales moléculas activas de las hojas de *Khat (Catha edulis).*

El surgimiento de las primeras catinonas sintéticas no se dio con el propósito de un consumo con fines recreativos, sin embargo, estas moléculas terminaron empleándose con estos fines principalmente porque su uso era muy discreto, lo cual, en un inicio, permitió que pasaran desapercibidas ante las autoridades. Diferentes catinonas sintéticas fueron probadas para su uso en tratamientos médicos, para citar algunos ejemplos, la metcatinona fue probada como agente analéptico y como estimulante locomotor (Felice *et al.*, 2014), la metcatinona fue la primera catinona sintética conocida junto a la mefedrona (4-metilmetcatinona), las cuales fueron sintetizadas por primera vez en 1928 y 1929 respectivamente (Coppola & Mondola, 2012; Felice *et al.*, 2014; João *et al.*, 2014; Espert *et al.*, 2015). Las catinonas sintéticas tienen una estrecha similitud con los derivados anfetamínicos en cuanto a la estructura química y los efectos generados sobre el sistema nervioso central (SNC) (Felice *et al.*, 2014), dicha similitud llevó a que se buscara una aplicación como antidepresivos y fármacos anoréxicos a la metcatinona, bupropion (*m*-cloro-*N*-*tert*-butil-catinona), dietilpropion (*N, N*-dietilcatinona) y dimetilpropion (*N, N*-dimetilcatinona), sin embargo, de las moléculas estudiadas, se observó que la metcatinona mostró un alto potencial adictivo, aún mayor que el de la cocaína y la catinona, que fue atribuido a la N-monometilación, fenómeno que también fue descrito para la anfetamina, que al monometilarse y pasar a ser metanfetamina se potenciaban los efectos generados sobre el SNC (Felice *et al.*, 2014; João *et al.*, 2014).

Tras el descubrimiento de diversos análogos sintéticos de la catinona, no se extendió el conocimiento de su uso recreativo hasta la entrada en vigor de las políticas planteadas en la Convención Única de 1961 sobre estupefacientes, y la posterior fiscalización de los estimulantes de tipo anfetamínico en el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971. Las sustancias denominadas anfetaminas fueron prohibidas e incluidas, la gran mayoría, en la lista 1, es decir, sustancias de mayor riesgo sin aplicación médica comprobada, lo que llevó a que se emplearan alternativas "legales" en el mercado de drogas para sustituir las sustancias que estaban bajo fiscalización (Espert *et al.*, 2015). De acuerdo con lo anterior, se dio lugar a la diversificación estructural de las sustancias fiscalizadas, pues la clasificación establecida en el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971 establecía una lista de sustancias sometidas a fiscalización, sin embargo, no contemplaba los análogos estructurales. Como respuesta a esta problemática se amplió la prohibición de las drogas a sus análogos en la Convención de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas realizada de 1988, fecha para la que ya se había acuñado el concepto de "Droga de diseño", planteándose como medida de control que toda droga de diseño se incluyera en la lista de sustancias fiscalizadas de acuerdo a su analogismo estructural con las drogas ya incluidas en esta lista *(Espert et al.*, 2015).

*e-mail: alugov@unal.edu.co

Como resultado de las medidas adoptadas en la Convención de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas (1988), las catinonas sintéticas ganaron popularidad en el mercado de las drogas de abuso ante la prohibición en muchos países de derivados anfetamínicos como la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), y se empezaron a presentar como alternativas legales, alcanzando su mayor popularidad en la primera década del 2000 (Coppola & Mondola, 2012; João *et al.*, 2014; Valento & Lebin, 2017; Graddy *et al.*, 2018), empleándose estrategias de comercialización para evadir el control de la justicia como la síntesis de sustancias con poca analogía con las sustancias prohibidas en la lista 1, vendiéndose con etiquetas con mensajes como "no apta para el consumo humano", "sales de baño", "mezclas herbales", "sustancias de investigación", entre otras, y valiéndose de tiendas virtuales para una comercialización más discreta (Coppola & Mondola, 2012; Cruz *et al.*, 2015; Espert *et al.*, 2015).

Las catinonas más consumidas en la segunda mitad de la primera década del siglo XXI fueron la 4-Metilmetcatinona (Mefedrona), la 3,4-Metilendioximetcatinona (Metilona) y la 3,4-Metilendioxipirovalerona (MDPV) (João *et al.*, 2014; Espert *et al.*, 2015). En 2009 las catinonas eran las drogas más populares en Reino Unido, año para el cual ya representaban un problema en Estados Unidos, donde estas tres sustancias lograban evadir el control de la justicia debido a que la ley contra drogas que estaba en vigencia para finales de la primera década del 2000 solo penalizaba la fabricación y posesión para uso humano (Prosser & Nelson, 2012), razón por la cual la Administración para el Control de Drogas (DEA, por sus siglas en inglés) intervino prohibiendo totalmente el 7 de septiembre de 2011 estas tres moléculas temporalmente, mientras se evaluaba la posibilidad de una prohibición permanente (Prosser & Nelson, 2012; Riley *et al.*, 2020), acción que llevó a que en 2012 estas catinonas sintéticas fueran incluidas en la lista 1 de sustancias prohibidas en Estados Unidos, de acuerdo con la clasificación establecida en el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971, y se incluyeran en la lista de drogas sintéticas de abuso (Espert *et al.*, 2015).

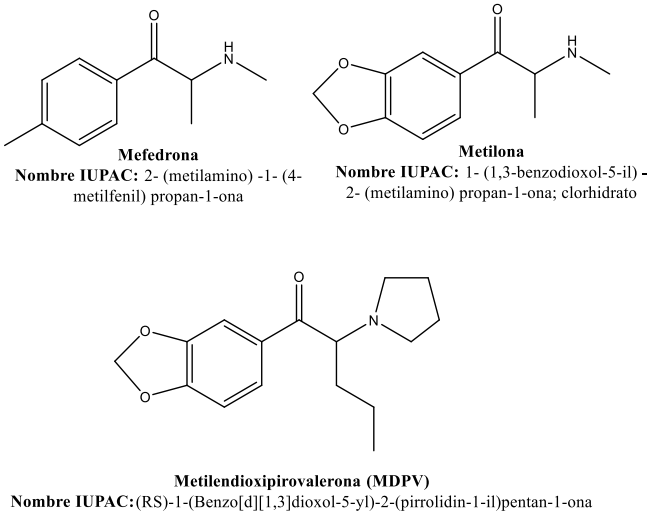


Figura 2: Estructura química de las catinonas sintéticas más consumidas en la primera década del siglo XXI.

El mismo fenómeno de diversificación estructural que se presentó luego de la fiscalización de otros grupos de sustancias psicoactivas no fue ajeno al grupo de las catinonas sintéticas, ante este panorama, se diversificó la cantidad de análogos estructurales que surgieron como alternativas para evadir a las autoridades. Se pueden citar algunos ejemplos como la bufedrona, metedrona, flefedrona, 3-fluorometcatinona, butilona y etilona, que emergieron en el mercado de las drogas de diseño tras la prohibición de la mefedrona (João *et al.*, 2014).

En Colombia, por medio de la ley 13 de 1974 se aprueba la Convención Única sobre Estupefacientes de 1961 y su protocolo de modificaciones de 1972. Mediante la ley 43 de 1980 se aprueba el Convenio sobre sustancias Sicotrópicas de 1971 y se autoriza al gobierno para adherirse a este, y mediante la ley 67 de 1993, se aprueba la Convención de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas de 1988. Por otra parte, mediante la ley 30 de 1986, se adopta el estatuto nacional de Estupefacientes, el cual se reglamenta mediante el decreto 3788 de 1986.

Como una herramienta para el seguimiento de la dinámica de las drogas, se crea el Sistema de Alertas Tempranas (SAT) del Observatorio de Drogas de Colombia (ODC) mediante la Resolución No. 001 de 2016 del Consejo Nacional de Estupefacientes. El Sistema de Alertas Tempranas ha informado desde su creación la aparición de nuevas sustancias en el mercado de las drogas de abuso, reportandose así, desde el observatorio de drogas de Colombia, por primera vez en 2013, la presencia de Metilona y Etilona en el país (ODC, 2017b).

Las nuevas alternativas emergentes en el mercado de las drogas de abuso implican a su vez la aparición de nuevos retos para la toxicología clínica y analítica (Tyrkko *et al.*, 2016), que deben responder a la dinámica judicial al momento de ejercer control sobre la fabricación, transporte, comercialización y consumo de estas sustancias. Es esta sincronía entre el aparato judicial y el mecanismo técnico-científico la que se ve afectada tras la aparición de nuevas sustancias psicoactivas.

La química analítica aplicada a la detección de sustancias psicoactivas ha servido de herramienta para el desarrollo de diferentes áreas del conocimiento como la toxicología y su aplicación a las ciencias forenses, siendo una herramienta de gran importancia al momento de impartir justicia, sin embargo, en las últimas décadas se ha evidenciado un aumento desproporcionado en el número de sustancias psicoactivas y en las estrategias con las cuales se ofertan en el mercado ilícito. Las técnicas voltamperométricas se presentan como una alternativa interesante para la detección de catinonas sintéticas, estas técnicas incluyen entre sus ventajas una alta sensibilidad, selectividad hacia especies electroactivas, un amplio rango lineal, instrumentación portátil y de bajo costo, capacidad de especiación y una amplia gama de electrodos que permiten ensayos de entornos inusuales. Además, las técnicas voltamperométricas pueden alcanzar límites de detección del rango nanomolar (Wang, 2006), comparables a los obtenidos con los procedimientos cromatográficos (Oiye *et al.*, 2009; Oiye *et al.*, 2017), con volúmenes de muestras muy pequeños (5-20 µL) (Wang, 2006), lo cual es un factor muy importante en ambientes complejos, como por ejemplo, en su aplicación a escenarios forenses donde el elemento material probatorio se puede encontrar en cantidades limitadas.

El presente artículo tiene como finalidad reportar una revisión sistemática de la información reciente disponible correspondiente a aspectos químicos y toxicológicos de las catinonas sintéticas, el panorama actual de estas y las tendencias actuales en cuanto a su estudio analítico, dedicando una sección a la revisión del estudio electroquímico de estas sustancias.

Métodos

Se realizó una búsqueda sistemática utilizando las bases de datos de: Springer Link, SciELO, Medline y Scopus. Las ecuaciones de búsqueda empleadas fueron: "synthetic cathinones", "Metabolism AND synthetic cathinones", "Forensic electrochemistry AND synthetic cathinones", "Electrochemistry AND abuse drugs", "chromatography AND synthetic cathinones". Se obtuvieron 150 referencias tras una revisión inicial, de las cuales se seleccionaron 62 para la elaboración de la presente revisión, posterior a un proceso de selección de referencias recientes, relacionadas con el enfoque de la revisión y tras eliminar documentos repetidos.

Resultados

Estructura química

Las catinonas sintéticas pertenecen al grupo los derivados de la

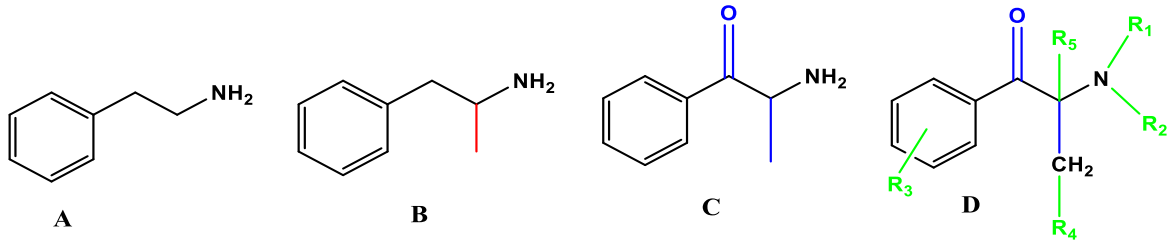


Figura 3: Diferencias estructurales entre **A:** fenetilamina, **B:** Anfetamina, **C:** Catinona y **D:** Catinona sintética.

fenetilamina, al igual que la anfetamina y sus derivados, siendo la estructura de fenetilamina el grupo farmacóforo, con semejanza estructural con los neurotransmisores dopamina y norepinefrina (Espert *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2017). Las catinonas sintéticas son β-ceto análogos de la anfetamina, es decir, con un grupo carbonilo unido al carbono β de la cadena amino-alquílica que a su vez está unida a un anillo de fenilo (Coppola & Mondola, 2012; Prosser & Nelson, 2012; Banks *et al.*, 2014), por lo que se les suele denominar *β-k*-anfetaminas (Prosser & Nelson, 2012). Al igual que el resto de moléculas de tipo fenetilamina, las catinonas pueden aparecer en dos formas estereoisoméricas, usualmente en forma de mezcla racémica, por lo que entre los estereoisómeros pueden haber diferencias en cuanto a efectos generados sobre el organismo, por otro lado, se cree que la coexistencia de dos formas estructurales se puede dar también a través de la tautomería ceto-enol (Coppola & Mondola, 2012).

Al poseer el mismo grupo farmacóforo que otras sustancias de tipo fenetilamina, como los derivados de tipo anfetamínico, se cree que sus mecanismos y efectos farmacológicos son similares (Banks *et al.*, 2014; Espert *et al.*, 2015), sin embargo, el grupo carbonilo ubicado en la posición β a la cadena amino-alquílica aumenta su polaridad y, por ende, reduce su permeabilidad en la barrera hematoencefálica, lo que disminuye la intensidad de los efectos generados (Coppola & Mondola, 2012; Prosser & Nelson, 2012). No obstante, la lipofilicidad de las catinonas puede aumentar a merced del tipo y el grado de sustitución, así pues, la adición de grupos aceptores de electrones como el fluor (como en la flefedrona y la 3-fluorometcatinona, por ejemplo), o el aumento de la longitud de la cadena carbonada sobre el grupo amino terminal o sobre el carbono α al grupo amino aumentan la lipofilicidad y podrían otorgarle a la molécula resistencia ante la degradación enzimática (Banks *et al.*, 2014).

Toxicología de las catinonas sintéticas

La información disponible acerca de aspectos toxicológicos relacionados con las catinonas sintéticas es limitada, esto se debe al reciente interés sobre estas sustancias, a la gran variabilidad estructural que se oferta en el mercado de las drogas y a que usualmente se comercializa mezclada con otras sustancias como anfetaminas y cafeína, lo cual dificulta tener un objetivo claro de estudio (Ferreira *et al.*, 2019).

Entre los efectos buscados por los consumidores se encuentran la euforia, empatía, aumento de la energía, aumento de las capacidades sociales y de trabajo, aumento de la libido sexual, entre otras (Coppola & Mondola, 2012; Tremeau-Cayel *et al.*, 2018). Entre los efectos adversos más comunes se reportan taquicardia, hipertensión, hipertermia, infarto de miocardio y muerte (Banks *et al.*, 2014).

Toxicocinética

Absorción

El modo de consumo de las catinonas sintéticas es muy variado, las formas más comunes son inhaladas, fumadas e inyectadas (Banks *et al.*, 2014).

La velocidad y la intensidad con la que se presentan los efectos psicoactivos dependen de la capacidad de las catinonas sintéticas para permear las membranas biológicas, y esta a su vez varía a merced de la estructura química de la molécula, por ejemplo, las catinonas que poseen un anillo de pirrolidina en su estructura tienen una mayor capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica debido a la baja polaridad de este (Coppola & Mondola, 2012; Prosser & Nelson, 2012). En relación con lo anterior, las catinonas sintéticas de tipo pirovalerona presentan una absorción rápida por vía oral e intravenosa en ratas, reportándose que solo un 29% de la dosis administrada vía oral no es absorbida y se mantiene en el estómago 30 minutos después de la administración oral (Prosser & Nelson, 2012).

En síntesis, se puede decir que cuanto mayor sea el patrón de sustitución de la molécula con grupos que le otorguen lipofilicidad, menor será el tiempo en que se observen los efectos psicoactivos. En el caso de las catinonas sintéticas de tipo pirovalerona, como característica principal se debe tener en cuenta el efecto generado por el anillo de pirrolidina unido a la amina terminal sobre la lipofilicidad de estas sustancias, ya que este grupo no solo le otorga protección ante la acción enzimática sobre la amina terminal, sino que hace que la molécula sea altamente lipofílica, penetre con gran facilidad la barrera hematoencefálica y tenga un alto volumen de distribución, con vidas medias tisulares y plasmáticas más largas (Simmler *et al.*, 2013; Rickli *et al.*, 2015; Nóbrega & Dinis-Oliveira, 2018). La velocidad de absorción depende, además, de la vía por la que se introduzca la sustancia al organismo, la absorción por vía nasal e intravenosa es mucho más rápida que la absorción por vía oral (Dargan *et al.*, 2011).

Los estudios toxicocinéticos de las catinonas sintéticas en humanos son muy limitados, pese a esto, se han reportado importantes avances en el modelo animal, siendo la mefedrona una de las moléculas del grupo de las catinonas sintéticas más estudiada, así pues, de acuerdo a experimentos con mefedrona en ratas, los efectos aparecen en pocos minutos por vía nasal e intravenosa, siendo un poco más lenta la aparición de los efectos por vía oral (15 a 45 minutos), en esta última vía la velocidad de absorción se ve disminuida por la presencia de alimentos en el estómago. En consecuencia, la duración de los efectos será afectada por la velocidad de absorción, reportándose que la duración del efecto de la mefedrona por vía nasal y oral fue de 2 a 3 horas y para la vía intravenosa fue de 15 a 30 minutos (Dargan *et al.*, 2011). Por otra parte, Martínez-Clemente *et al.* reportan un estudio de la toxicocinética de la mefedrona en ratas Sprague-Dawley macho donde demostraron que tras la administración de 10 mg/kg vía intravenosa y 30 a 60 mg/kg vía oral las concentraciones máximas de mefedrona en el organismo se alcanzaron entre las 0.5 y 1 h, siendo los niveles indetectables a las 9 h, también se estimó que la relación de niveles cerebrales/niveles plasmáticos libres es de 1.85±0.08, lo que indica que la mefedrona puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica (Martínez -Clemente *et al.*, 2013; Ellefsen *et al.*, 2016) .

Papaseit *et al.* reportaron un estudio concerniente a la farmacología de la mefedrona comparada con la de la MDMA en humanos, mediante la aplicación de un ensayo aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo en el que se suministró a 12 voluntarios varones 200 mg de mefedrona, 100 mg de MDMA y placebo para cuantificar posteriormente, por cromatografía de gases acoplada a espectromería de masas (GC/MS), la concentración plasmática de las sustancias estudiadas. Se reportó una concentración máxima plasmática de mefedrona 1.25 h después de la administración, y para la MDMA dicha

concentración se alcanzó 2 h después de la administración; en cuanto a la vida media plasmática se reportaron grandes diferencias, para la mefedrona la vida media plasmática fue de 2.15 h, mientras que para la MDMA fue de 7.89 h, lo cual se debe principalmente a las grandes diferencias de lipofilicidad generada por la presencia del grupo carboxilo en la estructura de la mefedrona y por la susceptibilidad a la acción enzimática que en comparación con la MDMA es mucho mayor, lo anteriormente descrito puede explicar el patrón de consumo compulsivo de la mefedrona (Papaseit *et al.*, 2016).

Distribución

La distribución de las catinonas sintéticas en el organismo ha sido poco estudiado, el modelo animal, sin embargo, ha permitido obtener algunos valores que pueden servir de indicativo. En ratones se ha encontrado que tras la administración de pirovalerona las concentraciones más altas de la sustancia se encuentran en bilis, hígado y riñones, siendo la concentración en cerebro de solo 1% de la dosis administrada (Prosser & Nelson, 2012).

Recientemente Vignali *et al.* reportaron los resultados obtenidos del análisis de α-pirrolidinohexiofenina (α-PHP) en sangre, orina, contenido gástrico, tejidos principales y cabello de una persona fallecida, a partir de muestras biológicas recogidas durante la autopsia en las cuales se cuantificó la concentración de α-PHP por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS). Las concentraciones más altas de la molécula cuantificada se encontraron en pulmón y bazo (71,1 y 83.8 ng/ml respectivamente), las concentraciones en bilis y orina (1.2 y 5.6 ng/ml respectivamente) fueron inferiores a las cantidades encontradas en la sangre recolectada de la cavidad torácica (15.3 ng/ml), las concentraciones en hígado, riñón, cerebro y corazón fueron de 3.5, 7.9,4.7 y 23.6 ng/ml respectivamente (Vignali *et al.*, 2019). Si bien los resultados del estudio dan una idea de la distribución de las catinonas en el organismo, se debe tener en cuenta que las concentraciones y los lugares donde se encuentra la molécula se pueden ver afectados por la redistribución *post mortem.*

Para la metilona se reporta, en experimentos con ratas, un alto volumen de distribución: 538 ml/kg para la vía intravenosa y 433 ml/kg para la vía oral, con una biodisponibilidad del 78-89% y aproximadamente un 13% de unión a proteínas (López-Arnau *et al.*, 2012). Por otra parte, para la mefedrona se estima que la biodisponibilidad total es de aproximadamente 10%, con un porcentaje unido a proteínas plasmáticas del 21.59±3.67%, en estudios hechos sobre ratas Sprague-Dawley macho (Martínez-Clemente *et al.*, 2013; Ellefsen *et al.*, 2016).

Biotransformación

Las principales reacciones que se dan lugar en la fase 1 del metabolismo de las catinonas sintéticas son la *N*-desmetilación, la reducción del grupo ceto a hidroxilo y la oxidación de los grupos alquilo del anillo bencénico (Meyer & Maurer, 2010; Coppola & Mondola, 2012). Pese a que el metabolismo enzimático de las catinonas sintéticas en el organismo puede variar a merced de polimorfimos genéticos, estructura química de la moléculas, entre otros, se ha reportado ampliamente que las catinonas sintéticas se metabolizan principalmente por la isoforma CYP2D6 del citocromo P450, con contribuciones menores de las isoformas CYP2C19, CYP1A2, CYP2C9, CYP2B6 y CYP3A4 (Pedersen *et al.*, 2013; Silva & Martínez, 2016; Tyrkko *et al.*, 2016; Manier *et al.*, 2018; Calinski *et al.*, 2019; Olesti *et al.*, 2019).

En moléculas que contienen un grupo metilendioxi como la metilona, la etilona y la butilona la principal reacción de fase 1 es la desmetilación del anillo metilendioxi, después de esto se da lugar a una *o*-metilación mediada por la enzima *o*-metiltransferasa de donde resultan dos posibles metabolitos: 4-hidroxi-3-metoxi o 3-hidroxi-4-metoxi. En la fase 2 del metabolismo estos metabolitos se conjugan con ácido glucurónico y sulfatos, siendo así excretados en la orina junto con moléculas no metabolizadas (Meyer & Maurer, 2010; Meyer *et al.*, 2010; Coppola & Mondola, 2012; Prosser & Nelson, 2012). Por otro lado, en moléculas que no tienen un grupo metilendioxi, como la mefedrona, la reacción más importante del metabolismo de fase 1 es la *N*-desmetilación que conduce a la formación una amina primaria, seguida de la reducción del carbonilo del grupo ceto a hidroxilo (formación de alcoholes), por último, el grupo tolilo se oxida al alcohol correspondiente. La fase 2 consiste en conjugaciones con ácido glucurónico y sulfatos (Meyer & Maurer, 2010; Meyer *et al.*, 2010; Coppola & Mondola, 2012; Prosser & Nelson, 2012).

Para la metilendioxipirovalerona (MDPV) que contiene un grupo pirrolidin en su estructura se propone que, como resultado del metabolismo de fase 1, los principales metabolitos son catecolpirovalerona y metilcatecolpirovalerona (Strano-Rossi *et al.*, 2010; Coppola & Mondola, 2012; Prosser & Nelson, 2012), que se generan por la apertura del anillo metilendioxi, con una posterior desmetilación que conduce a la formación del catecol, seguida de una metilación generada por la enzima catecol *O*-metiltransferasa (COMT) (Strano-Rossi *et al.*, 2010; Prosser & Nelson, 2012), conociéndose mediante ensayos *in-vitro* con microsomas hepáticos humanos y fracciones celulares que el 80% de la molécula de MDPV no se metabolizaba, el 10% se metabolizaba a metilcatecolpirovalerona y el 7% a catecolpirovalerona, dato que, según los autores, pueden verse afectados por la alta concentración de MDPV empleada para el experimento, además se determinó que las isoformas de citocromo P-450 involucradas en el metabolismo *in-vitro* de MDPV fueron CYP2C19, 2D6 y 1A2 (Strano-Rossi *et al.*, 2010; Coppola & Mondola, 2012; Prosser & Nelson, 2012). En cuanto al metabolismo de fase 2, este consiste en conjugaciones con ácido glucurónico y sulfato que según lo reportado por Strano-Rossi *et al.* (2010) se dan en proporción de 40% y 50% respectivamente.

Eliminación

La vida media de eliminación para la metilona luego de la administración vía intravenosa a ratas es de 0.95 h, y 0.55 h por vía oral (López-Arnau *et al.*, 2012). De igual manera, se reportó que la vida media de eliminación de la mefedrona por vía intravenosa es de 0.37 h y por vía oral de 0.55 h (Martínez-Clemente *et al*., 2013).

Namera *et al.* estimaron la vida media de eliminación de α-pirrolidinopentiofenona (α-PVP) y α-pirrolidinobutiofenona (α-PBP) a partir del monitoreo de la concentración en orina de estas dos sustancias en un individuo después de la administración intravenosa, proponiéndose una vida media de eliminación estimada de 22 h para α-PVP y 11 h para α-PBP, e informándose que el pH de la orina puede alterar las vidas medias de eliminación, ya que a pH ácido la tasa de eliminación puede aumentar (Namera *et al.*, 2013).

En términos de porcentajes, luego de la administración de pirovalerona por vía oral en ratones se reporta una eliminación del 70% en la orina, sin embargo, para la administración por vía intravenosa fue de un 90% como metabolitos y un 6-8% como compuesto inalterado (Prosser & Nelson, 2012). El porcentaje de compuesto inalterado eliminado es mucho mayor que el reportado para la catinona, molécula naturalmente encontrada en la planta *Catha edulis*, que fue del 2%, con una vida media de eliminación de aproximadamente 5.2 h (Coppola & Mondola, 2012).

Toxicodinamia

Debido a la similitud estructural que existe entre las catinonas sintéticas y los derivados de la anfetamina se puede predecir que sus mecanismos toxicodinámicos son similares, por lo que se sabe que las catinonas centran sus efectos en el sistema nervioso mediante la alteración de los sistemas monoaminérgicos centrales y periféricos, como mecanismo primario (Espert *et al.*, 2015).

Se han definido dos posibles mecanismos (German *et al*., 2014), totalmente contrarios entre ellos, pero que, sin embargo, conllevan al aumento de la concentración de catecolaminas en la hendidura sináptica:

El primer mecanismo consiste en el bloqueo de la recaptación de los transportadores de dopamina (DAT) y serotonina (SERT), los cuales tienen la función de regular los niveles de neurotransmisores en el hendidura sináptica, fenómeno que genera que la concentración de neurotransmisores aumente tras su liberación natural, pero que no puedan reingresar al espacio presináptico (Felice *et al.*, 2014; German *et al.*, 2014; Espert *et al.*, 2015).

El segundo mecanismo consiste en la elevación de la liberación presináptica de neurotransmisores, específicamente en la vesícula presináptica, generada por la entrada de otros neurotransmisores relacionados con los sistemas colinérgicos o glutamatérgicos (Felice *et al.*, 2014; German *et al.*, 2014; Espert *et al.*, 2015).

El mecanismo de acción de las catinonas puede depender la estructura molecular, por ejemplo, moléculas como la metilona y mefedrona pueden aumentar la liberación de dopamina desde el espacio presináptico a la hendidura sináptica, por una despolarización interna de las células en reposo (Felice *et al*., 2014).

Por su parte, la metilendioxipirovalerona (MDPV) es un inhibidor de la recaptación de neurotransmisores (Felice *et al.*, 2014), que se une a los transportadores de neurotransmisores como los transportadores de dopamina (DAT) y serotonina (SERT), los cuales regulan la cantidad de neurotransmisores en la hendidura sináptica, alterando el alcance y la duración de la señalización entre neuronas (Espert *et al.*, 2015). En el caso de las anfetaminas, el efecto de inhibición de los transportadores puede generar una pérdida en la función del transportador, fenómeno que se asocia a los efectos agudos, y conlleva a deficiencias a largo plazo en los sistemas de la dopamina (DA) y serotonina (5-HT) tras la exposición a niveles tóxicos (Espert *et al.*, 2015).

Las catinonas sintéticas pueden afectar algunos sistemas de órganos autónomos mediante la alteración de las monoaminas periféricas, como la norepinefrina (NE), las cuales son importantes reguladores de la función del sistema nervioso autónomo, lo que puede llevar a alteraciones en órganos del sistemas periférico tales como los sistemas cardiovascular y digestivo (Espert *et al.*, 2015).

En el mercado actual de nuevas sustancias psicoactivas se suelen comercializar las catinonas sintéticas como mezcla de catinonas, lo que abre la posibilidad de que el consumidor experimente mecanismos de elevación de la liberación de neurotransmisores y mecanismos de inhibición de la recaptación de estos al mismo tiempo (Felice *et al.*, 2014). Por otro lado, se pueden presentar mezclas de catinonas con otras sustancias como anfetaminas o cocaína, los cual puede amplificar la toxicidad por efecto del sinergismo y aumentar la probabilidad de un desenlace fatal (Espert *et al*., 2015).

Catinonas sintéticas: panorama actual

Las catinonas sintéticas son parte de las denominadas "nuevas sustancias psicoactivas", término que no hace referencia a sustancias de reciente síntesis sino a sustancias que a pesar de ser ya documentada su síntesis se conocen como nuevas sustancias por su reciente aparición en el mercado de las sustancias psicoactivas y por no estar en un principio fiscalizadas (Silva & Martínez, 2016).

Según el Reporte Mundial de Drogas, emitido por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), en la mayoría de los años registrados, las nuevas sustancias psicoactivas (NSP) estimulantes han sido el grupo más grande de sustancias identificado e informado por los Estados miembros, con un aumento durante el periodo 2009-2017 de cuatro veces, pasando de 48 sustancias identificadas en 2009 a 206 en 2015, valor que se ha mantenido estable hasta la actualidad (UNODC, 2019). Las NSP estimulantes más ampliamente incautados entre 2014 y 2017 fueron las catinonas sintéticas, las incautaciones de estas aumentaron en un 4% (a 2,8 toneladas) en 2017 con respecto al año anterior, lo cual generó que las cantidades de NSP estimulantes incautadas aumentaran ligeramente (5%) en el mismo periodo (UNODC, 2019).

En el 2012 la incautación de mefedrona alcanzó un pico de 4,2 toneladas a nivel mundial, centrándose la mayor parte de las incautaciones en Reino Unido (UNODC, 2019). En el periodo 2014-2017 la mefedrona fue la sustancia con mayor cantidad de incautaciones en Rusia, siendo de 0,7 toneladas en 2014, 3,1 toneladas en 2015 y 2 toneladas en 2016 (UNODC, 2019). También se informó que durante el período 2013-2017 se dio la mayor cantidad de incautaciones de mefedrona en Reino Unido, además de India, Polonia, China, entre otros, que suman un total de 20 países que reportaron el decomiso de mefedrona en este periodo (UNODC, 2019). Contrariamente a los esperado, luego de que se fortaleciera el control de este tipo de drogas en 2015, se observó un aumento en las incautaciones de mefedrona, especialmente en Europa, probablemente debido a que esta sustancia ha establecido su propio mercado y este mercado puede evolucionar en respuesta a las políticas de control. Tras el aumento del control internacional, algunas catinonas sintéticas como la MDPV alcanzaron en 2017 sus niveles más bajos de incautaciones, luego de que su punto más alto de incautaciones fuera en 2013 (UNODC, 2019).

Los cambios en las políticas antidroga y el evidente aumento en el control de estas ha conllevado a que diferentes catinonas sintéticas como mefedrona, 3-metilmetcatinona (3-MMC) , 4-metiletilcatinona, pentedrona y derivados de tipo pirovalerona como como MDPV y α-PVP pasaran de ser nuevas sustancias psicoactivas no fiscalizadas para estar en la lista de sustancias prohibidas (UNODC, 2019). El mercado de las drogas de abuso es dinámico, y la variabilidad estructural, debida a los múltiples patrones de sustitución de las moléculas, permiten la rápida búsqueda de nuevas alternativas a las sustancias prohibidas, por ejemplo, en Eslovenia, después de la prohibición de la mefedrona, los usuarios de esta sustancia psicoactiva buscaron los mismos efectos en otras catinonas sintéticas como 3-MMC, metilona, 4-metiletcatinona y pentedrona, además de reportarse el uso simultaneo de 3-MMC con opioides como medida de sustitución de la cocaína (UNODC, 2019).

En Colombia se reportaron en el periodo 2006-2017 la aparición de 28 nuevas sustancias psicoactivas, de las cuales 7 corresponden a catinonas sintéticas. Se observó que el 2016 fue el año con el aumento más significativo en el número de catinonas sintéticas reportadas (ODC, 2017b). La aparición de catinonas sintéticas en el escenario Colombiano se inició en el 2013, cuando se conoció la iniciativa de ingresar la metilona y otras catinonas sintéticas al país haciendolas pasar como "destapacañerías" para evadir el control de la justicia (ODC, 2017a).

En el periodo 2013-2014 se reportó el hallazgo de etilona y α-PVP en el territorio nacional, y para el año 2016 se detectó la presencia de butilona, dibutilona, dimetilona y n-etilpentilona (ODC, 2017b). Esta gran variabilidad de sustancias reportadas emergen con el objetivo de evadir el control ejercido por la legislación colombiana, lo que las hace alternativas tentadoras para sustituir a las anfetaminas controladas como la MDMA debido a su similitud en cuanto a efectos generados (ODC, 2017b, 2017a).

La dinámica en el mercado de las nuevas sustancias psicoactivas en Colombia contrasta con el panorama mundial, sabiéndose que algunos reportes como el de la *N*-etilpentilona en Colombia fueron de los primeros a nivel mundial (ODC, 2017b).

Detección analítica de catinonas sintéticas

Se realizó una búsqueda de los reportes científicos recientes relacionados con la aplicación de técnicas analíticas a la detección de catinonas sintéticas. Como resultado de la búsqueda se obtuvieron 25 artículos científicos, de los cuales se incluyeron 12 en la presente revisión, ver **Tabla 1**.

Como se observa en la tabla 1, a pesar de que las catinonas sintéticas son relativamente nuevas en el mercado de las sustancias psicoactivas, se han reportado diferentes estudios a nivel mundial en los últimos años, el constante reporte de artículos científicos donde se aplican técnicas cromatográficas permite que el estado actual del estudio de estas sustancias en cuanto a su determinación analítica esté actualizado

Tabla 1. *Técnicas analíticas más empleadas para el análisis de catinonas sintéticas.*

Técnicas	Matriz	País	Cita
GC/CI-MS y LC-DAD	Material incautado en forma de polvo cristalino	China	(Cheng and Wong 2019)
LC-MS/MS	Material incautado en forma de polvo cristalino	España	(Fabregat-Safont *et al.*, 2019)
LC-MS/MS	Cabello/*post mortem*	Italia	(Freni *et al.*, 2019)
GC-MS	Orina	Italia	(Gerace *et al.*, 2019)
HPLC-MS/MS	Orina	España-Italia	(Sánchez-González *et al.*, 2019)
GC-MS y GC-MS/MS	Patrones de referencia	Estados Unidos	(Levitas *et al.*, 2018)
LC-QTOF-MS	Aguas residuales	Bélgica -Suiza	(Kinyua *et al.*, 2018)
GC-MS, FTIR, HRMS Y RMN	Material incautado en forma de polvo blanco	España	(Fabregat-Safont *et al.*, 2018)
GC-MS	Orina	Reino Unido	(Alsenedi and Morrison 2018)
GC/NCI-MS	Orina y plasma	Emiratos Árabes Unidos	(Alremeithi *et al.*, 2018)
UHPLC-QTOF-MS, GC-MS y RMN	Material incautado	China	(Liu *et al.*, 2017)
LC-HRMS	Aguas residuales	España	(Fontanals and Borrull 2017)

GC/CI-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización química; **LC-DAD:** Cromatografía de líquidos con detector de arreglo de diodos; **LC-MS/MS:** Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem; **GC-MS:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; **HPLC-MS/MS:** Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem; **GC-MS/MS:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem; **LC-QTOF-MS:** cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo con tiempo de vuelo; **FTIR:** Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier; **HRMS:** Espectrometría de masas de alta resolución; **RMN:** Resonancia magnética nuclear; **GC/NCI-MS:** cromatografía de gases con ionización química negativa acoplada a espectrometría de masas; **UHPLC-QTOF-MS:** cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo con tiempo de vuelo; **LC-HRMS:** Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

(Carlsson *et al.*, 2018). Es de destacar que, pese a que las matrices más exploradas son el material incautado, principalmente en forma de polvo cristalino, y las matrices biológicas, se puede evidenciar también un crecimiento en el interés por estudiar matrices ambientales.

Las investigaciones recientes abordan un nuevo enfoque, el cual consiste en el mejoramiento de condiciones analíticas para optimizar el desempeño de las técnicas aplicadas, esto surge tras ser evidente la complejidad que exige el análisis de catinonas sintéticas, principalmente por la interferencia de otras sustancias, ya sean análogos estructurales o agentes de corte.

Entre las estrategias reportadas para el mejoramiento de las señales cromatográficas se destaca el reporte de Levitas *et al.* en el cual se mejora la señal espectral aplicando un método de ionización electrónica a bajas temperaturas y se evidencia la mejora de resultados obtenidos con un sistema GC-MS/MS frente a un sistema GC-MS (Levitas *et al.*, 2018).

Por otra parte, debido a que el análisis de catinonas sintéticas se ve afectado por la presencia de adulterantes que agregan complejidad a la matriz de análisis, se evidencia el interés por separar los componentes de la muestra mediante una separación previa al análisis (Carnes *et al.*, 2017; Fontanals & Borrull, 2017; Alsenedi & Morrison, 2018; Sánchez-González *et al.*, 2019), lo que permite la obtención de resultados sin la interferencia de los componentes que acompañan al analito en la matriz de análisis.

Detección electroquímica de catinonas sintéticas

La detección y cuantificación de drogas de abuso por métodos electroquímicos se ha centrado en tres matrices analíticas principalmente: muestras de calle o muestras incautadas comúnmente en forma de polvo cristalino, soluciones libres o impregnadas en papel secante, comprimidos, materiales fumables, entre otros; fluidos biológicos y en menor proporción en muestras ambientales como aguas residuales (Florea *et al.*, 2018).

Las drogas ilícitas más estudiadas por métodos electroquímicos han sido la cocaína (Oiye *et al.*, 2009; Balbino *et al.*, 2012; De Jong *et al.*, 2016; Balbino *et al.*, 2016), la marihuana (Balbino *et al.*, 2012; Balbino *et al.*, 2016), la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) (Merli *et al.*, 2014) y de forma creciente se ha aumentado el interés por estudiar las nuevas sustancias psicoactivas, también llamadas "drogas de diseño" como las sustancias del grupo de las anfetaminas (Švorc *et al.*, 2014; Tadini *et al.*, 2014; Cumba *et al.*, 2016), sustancia del grupo de las piperazinas (Waddell *et al.*, 2017) y derivados de la feniletilamina como los NBOMes (Andrade *et al.*, 2016; Oiye *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017). En la mayor parte de estos estudios se ha reportado que los métodos voltamperométricos generan resultados comparables (Oiye *et al.*, 2009, 2017) o mejores a los obtenidos por métodos cromatográficos (Cumba *et al.*, 2016).

La rápida y progresiva aparición de catinonas sintéticas en diferentes matrices hace necesario para las autoridades contar con herramientas de campo versátiles y confiables que permitan detectar este voluminoso grupo de sustancias (Smith *et al.*, 2014; Zuway *et al.*, 2015; Elbardisy *et al.*, 2019). Los métodos electroquímicos se muestran como una alternativa para suplir esta necesidad, observándose un reciente interés, evidenciado en el crecimiento de los reportes de detección de estas sustancias mediante la aplicación de métodos electroanalíticos.

Tabla 2. *Reportes científicos referentes a análisis electroquímico de catinonas sintéticas.*

Sustancias	Matriz	Tipos de electrodo	País	Cita
Metcatinona y catinona	Suero	Serigrafiados	China	(Zang *et al.*, 2013)
Metcatinona, mefedrona y 4-metiletcatinona	Sales de hidrocloruro o hidrobromuro sintetizadas en laboratorio	Diamante dopado con boro, carbono vítreo y serigrafiado de carbono	Reino Unido	(Smith *et al.*, 2013)
Mefedrona y 4-metiletcatinona	Muestras callejeras de NRG-2 (nombre popular de la 4-metiletcatinona) en forma de polvo cristalino blanco	Serigrafiados de carbono	Reino Unido	(Smith *et al.*, 2014)
Mefedrona y 4-metiletcatinona	Muestras callejeras de NRG-2 (nombre popular de la 4-metiletcatinona) en forma de polvo cristalino blanco	Fabricado con moneda británica de 1 penique	Reino Unido	(Tan *et al.*, 2015)
Mefedrona y 4-metiletcatinona	Muestras callejeras de NRG-2 (nombre popular de la 4-metiletcatinona)	Serigrafiados de grafito	Reino Unido	(Zuway *et al.*, 2015)
Etilona	Muestras de calle en forma de píldoras	Diamante dopado con boro	Brasil	(Scheel *et al.*, 2018)
Mefedrona	Orina y plasma	Impresos molecularmente, basados en la tecnología sol-gel y politiramina	Irán	(Razavipanah *et al.*, 2018)
Mefedrona: Nor-mefedrona y dihidromefedrona.	Orina	Serigrafiados de grafito	Reino Unido – Egipto	(Elbardisy *et al.*, 2019)

A pesar de que las catinonas sintéticas son un grupo de sustancias con gran variabilidad estructural y su popularidad en el mercado de las nuevas sustancias de abuso es reciente, se han reportado diferentes estudios para su determinación y cuantificación en diferentes matrices, sin embargo, los estudios basados en técnicas electroquímicas son limitados.

Zang *et al.* desarrollaron un conjunto de sensores serigrafiados basados en una película impresa molecularmente mediante electropolimerización con catinona, metcatinona como moldes y pirrol como monómero, mejorado con grafeno-NH_2 como material de soporte para la detección simultanea de metcatinona y catinona en muestras de suero, la superficie de los electrodos fueron caracterizados mediante voltamperometría cíclica y se probó usando voltamperometría de pulso diferencial, demostrando que el método proporcionaba una detección rápida, sensible y rentable, destacando el efecto del uso de grafeno-NH_2 en términos de mejoramiento de la conductividad del electrodo y cinética de adsorción rápida, obteniendo límites de detección de 3.3 y 8.9 pg mL^{-1} para metcatinona y catinona, respectivamente (Zang *et al.*, 2013).

Por otra parte, Smith *et al.* demostraron la detección de tres catinonas sintéticas: (±)-Metcatinona, (±)-Mefedrona y 4-MEC, en este estudio se probaron tres diferentes electrodos: de diamante dopado con boro (DDB), carbono vítreo y serigrafiado de grafito, concluyendo que el electrodo con mejor comportamiento durante el estudio fue el serigrafiado de grafito, la detección fue dependiente del pH de la matriz analítica y se vio limitada por este factor, disminuyendo la selectividad entre las diferentes catinonas sintéticas estudiadas, y entre estas y los adulterantes cafeína y benzocaína (Smith *et al.*, 2014).

Posteriormente, en un segundo estudio Smith *et al.* aplicaron electrodos de grafito serigrafiado para la detección electroquímica de 4-MMC Y 4-MEC por voltamperometría cíclica en la que se obtuvieron límites de detección de 11.80 µg mL^{-1} para 4-MMC y 11.60 µg mL^{-1} para 4-MEC sin observarse mejora tras la modificación de la superficie con una película de mercurio y bismuto (Smith *et al.*, 2014b).

En 2015 Zuway *et al.* desarrollaron y validaron la detección amperométrica de 4-MMC Y 4-MEC empleando cromatografía liquida de alta eficacia acoplada a un detector amperométrico (HPLC-AD) y comparando los resultados con los obtenidos por cromatografía liquida de alta eficacia acoplada a espectroscopía UV (HPLC-UV). A pesar de que los límites de detección obtenidos por el método HPLC-AD no fueron superiores a los obtenidos por HPLC-UV, se eliminó la interferencia entre las señales amperométricas de 4-MMC y 4-MEC comunes en los métodos voltamperométricos sin un proceso de separación cromatográfico previo (Zuway *et al.*, 2015). En el mismo año, Tan *et al.* reportan por primera vez el desarrollo de un método basado en un sensor electroquímico construido con una moneda de un penique británico para la detección de mefedrona (4-MMC) y 4-MEC, el método fue validado para su aplicación en una matriz analítica en forma de polvo cristalino obtenida de muestras de NRG-2 (nombre popular de la 4-metiletcatinona) obtenidas en el mercado callejero, adicionalmente fue comparado con un método basado en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) demostrándose que el método es aplicable para la finalidad con la que fue validado (Tan *et al.*, 2015).

Scheel *et al.* desarrollaron un método voltamperométrico para la determinación de etilona en muestras incautadas mediante voltamperometría de pulso cíclico, diferencial y de onda cuadrada usando un electrodo de diamante dopado con boro (DDB), observaron que la señal voltamperométrica de los adulterantes de las muestras no interferían en la señal de la etilona a excepción de la señal de la cafeína, efecto que fue corregido mediante previa extracción en fase solida con una columna de octadecil sílice, obteniendo así un método electroanalítico sensible, simple y con diferencias estadísticas no significativas en comparación con los métodos cromatográficos (Scheel *et al.*, 2018).

Razavipanah *et al.* desarrollaron un sensor electroquímico basado en un polímero sol-gel impreso molecularmente y modificado para la identificación y cuantificación indirecta de mefedrona en solución a partir del cambio en la respuesta de la sonda $[Fe(CN)]^{-3/-4}$. La caracterización electroquímica se hizo mediante voltamperometría cíclica y las mediciones electroquímicas se realizaron por voltamperometría de onda cuadrada. Bajo condiciones experimentales optimizadas se alcanzó un límite de detección de 0.8 nM (142 pg mL^{-1}) (Razavipanah *et al.*, 2018).

Recientemente Elbardisy *et al.* desarrollaron un protocolo para la detección electroquímica de mefedrona (4-MMC) y dos metabolitos de mefedrona: Nor-mefedrona y dihidromefedrona, mediante voltamperometría cíclica y de pulso diferencial, empleando electrodos de grafito serigrafiados y tomando orina humana como matriz de análisis. Como resultado, reportan una herramienta novedosa y portátil, que puede ser aplicada en campo y que permite la identificación y cuantificación de metabolitos de mefedrona en orina, además de ser rápida y barata (Elbardisy *et al.*, 2019).

El enfoque en análisis electroquímico de catinonas sintéticas apunta hacia el diseño de sistemas miniaturizados que permitan un análisis rápido y de campo.

Conclusiones

El control del consumo, transporte, venta y fabricación de sustancias psicoactivas a nivel mundial genera que el mercado de las drogas de abuso sea más dinámico, lo cual repercute en el aumento de la oferta de nuevas sustancias psicoactivas que emergen con el fin de evadir el control judicial. El aumento en el número de sustancias que se ofertan en el mercado de drogas de abuso a nivel mundial genera grandes retos desde los diferentes puntos en los que se puede estudiar la situación: social, legal, científico, entre otros. Desde la perspectiva técnico-científica de la toxicología no cabe duda de que, según la revisión de la información actual, existen grandes vacíos que alimentan la complejidad del abordaje toxicológico de la situación, principalmente desde el punto de vista de la toxicología clínica y analítica.

Es ostensible en la evidencia científica reportada hasta el momento que la detección analítica de las catinonas sintéticas debe responder e ir a la velocidad con la que demuda el mercado de estas sustancias, respondiendo a su vez a las necesidades del aparato legal y la capacidad de respuesta desde el abordaje de la toxicología clínica, por tanto, es evidente que se requieren nuevos métodos de detección analítica que permitan obtener resultados rápidos y que amplíen su ambiente de trabajo a la detección en campo.

Las técnicas electroquímicas tienen gran potencial para responder a la problemática actual en el campo de la detección de sustancias psicoactivas y en específico a la problemática de las catinonas sintéticas, tema en el que se enfoca la presente revisión, pese a ello, existen pocos reportes relacionados con la aplicación de técnicas electroanalíticas para la detección y cuantificación de catinonas sintéticas, a pesar de que en los últimos años ha ido creciendo el interés por este enfoque.

Bibliografía

1. *Alremeithi R, Meetani MA, Alaidaros AA, Lanjawi A, Alsumaiti K.* Simultaneous Quantitative Determination of Synthetic Cathinone Enantiomers in Urine and Plasma Using GC-NCI-MS. *J.* Anal. Methods Chem. 2018; 1–11.
2. *Alsenedi KA, Morrison C.* Determination of amphetamine-type stimulants (ATSs) and synthetic cathinones in urine using solid phase micro-extraction fibre tips and gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Methods. 2018; 10(12), 1431–1440.
3. *Andrade BA, Mamo SK, Gonzalez-Rodriguez J.* Rapid screening method for new psychoactive substances of forensic interest: Electrochemistry and analytical determination of phenethylamines derivatives (NBOMe) via cyclic and differential pulse voltammetry. Anal. Chem. 2017; 89(3), 1445–1452.

4. *Balbino M A, Oiye ÉN, Ribeiro FM, Júnior WC, Eleotério IC, Ipólito AJ, de Oliveira, MF.* Use of screen-printed electrodes for quantification of cocaine and Δ9-THC: adaptions to portable systems for forensic purposes. J. Solid State Electrochem. 2016; 20(9), 2435–2443.

5. *Balbino MA, De Menezes MT, Eleotério IC, Saczk AA, Okumura LL, Tristão HM, De Oliveira MF.* Voltammetric determination of Δ9-THC in glassy carbon electrode: An important contribution to forensic electroanalysis. Forensic Sci Int. 2012; 221(1–3), 29–32.

6. *Banks ML, Worst TJ, Rusyniak DE, Sprague JE.* Synthetic cathinones ("Bath Salts"). J. Emerg. Medicine. 2014; 46(5), 632–642.

7. *Calinski DM, Kisor DF, Sprague JE.* A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on drug pharmacokinetics. Psychopharmacology (Berl). 2019; 236(3), 881–890.

8. *Carlsson A, Sandgren V, Svensson S, Konradsson P, Dunne S, Josefsson M, Dahlén J.* Prediction of designer drugs: Synthesis and spectroscopic analysis of synthetic cathinone analogs that may appear on the Swedish drug market. Drug Test. Anal. 2018; 10(7), 1076–1098.

9. *Carnes S, O'Brien S, Szewczak A, Tremeau-Cayel L, Rowe WF, McCord B, Lurie IS.* Comparison of ultra high performance supercritical fluid chromatography, ultra high performance liquid chromatography, and gas chromatography for the separation of synthetic cathinones. J. Sep Sci. 2017; 40(17), 3545–3556.

10. *Cheng WC, Wong WC.* Forensic drug analysis of chloro-N,N-dimethylcathinone (CDC) and chloroethcathinone (CEC): Identification of 4-CDC and 4-CEC in drug seizures and differentiation from their ring-substituted positional isomers. Forensic Sci. Int. 2019; 298, 268–277.

11. *Coppola M, Mondola R.* Synthetic cathinones : Chemistry , pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as " bath salts " or " plant food ". Toxicol Lett. 2012; 211(2), 144–149.

12. *Cruz SL, Rivera MT.* Las nuevas drogas : origen , mecanismos de acción y efectos . Una revisión de la literatura. RIIAD. 2015; 52(55), 68–76.

13. *Cumba LR, Smith JP, Zuway KY, Sutcliffe OB, Do Carmo DR, Banks CE.* Forensic electrochemistry: Simultaneous voltammetric detection of MDMA and its fatal counterpart "dr Death" (PMA). Anal. Methods. 2016; 8(1), 142–152.

14. *Dargan PI, Sedefov R, Gallegos A, Wood DM.* The pharmacology and toxicology of the synthetic cathinone mephedrone (4-methylmethcathinone). *Drug Test. Anal.* 2011; 3(7–8), 454–463.

15. *De Felice LJ, Glennon RA, Negus SS.* Synthetic cathinones : Chemical phylogeny, physiology, and neuropharmacology. Life Sci. 2014; 97(1), 20–26.

16. *De Jong M, Sleegers N, Kim J, Van Durme F, Samyn N, Wang J, De Wael K.* Electrochemical fingerprint of street samples for fast on-site screening of cocaine in seized drug powders. Chem. Sci. 2016; 7(3), 2364–2370.

17. *Elbardisy HM, García-Miranda A, Foster CW, Sutcliffe OB, Brownson AC, Belal TS, Talaat W, Daabezes HG, Banks CE.* Forensic Electrochemistry: The Electroanalytical Sensing of Mephedrone Metabolites. ACS Omega. 2019; 4(1), 1947–1954.

18. *Ellefsen KN, Concheiro M, Huestis MA.* Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases. *Drug Metab. Rev.* 2016; 48(2), 237–265.

19. *Espert R, Pérez J, Gadea M, Oltra-Cucarella J, Aliño M.* Drogas emergentes: catinonas sintéticas ("sales de baño"). Rev. Esp. Drog. 2015; 40(2), 56–71.

20. *Fabregat-Safont D, Carbón X, Gil C, Ventura M, Sancho JV, Hernández F, Ibáñez M.* Reporting the novel synthetic cathinone 5-PPDI through its analytical characterization by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. Forensic Toxicol. 2018; 36(2), 447–457.

21. *Fabregat-Safont D, Sancho JV, Hernández F, Ibáñez M.* Rapid tentative identification of synthetic cathinones in seized products taking advantage of the full capabilities of triple quadrupole analyzer. Forensic Toxicol. 2019; 37(1), 34–44.

22. *Feng LY, Battulga A, Han E, Chung H, Li JH.* New psychoactive substances of natural origin : A brief review. J. Food Drug Anal. 2017; 25, 461–471.

23. *Ferreira C, Vaz AR, Florindo PR, Lopes Á, Brites D, Quintas A.* Development of a high throughput methodology to screen cathinones' toxicological impact. Forensic Sci. Int. 2019; 298, 1–9.

24. *Florea A, De Jong M, De Wael K.* Electrochemical strategies for the detection of forensic drugs. *Curr Opin. Electrochem.* 2018; 6(11), 34–40.

25. *Fontanals N, Marcé RM, Borrull F.* Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to determine synthetic cathinones in different types of environmental water samples. J. Chromatogr. A. 2017; 1524, 66–73.

26. *Freni F, Bianco S, Vignali C, Groppi A, Moretti M, Osculati AMM, Morini L.* A multi-analyte LC–MS/MS method for screening and quantification of 16 synthetic cathinones in hair: Application to postmortem cases. Forensic Sci. Int. 2019; 298, 115–120.

27. *Gerace E, Caneparo D, Borio F, Salomone A, Vincenti M.* Determination of several synthetic cathinones and an amphetamine-like compound in urine by gas chromatography with mass spectrometry. Method validation and application to real cases. J. Sep. Sci. 2019; 42(8), 1577–1584.

28. *German CL, Fleckenstein AE, Hanson GR.* Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon. Life Sci. 2014; 97(1), 2–8.

29. *Graddy R, Buresh ME, Rastegar DA.* New and Emerging Illicit Psychoactive Substances. Med. Clin. North Am. 2018; 102(4), 697–714.

30. *Kinyua J, Negreira N, McCall AK, Boogaerts T, Ort C, Covaci A, van Nuijs A.* Investigating in-sewer transformation products formed from synthetic cathinones and phenethylamines using liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Sci. Total Environ. 2018; 634, 331–340.

31. *Levitas MP, Andrews E, Lurie I, Marginean I.* Discrimination of synthetic cathinones by GC–MS and GC–MS/MS using cold electron ionization. *Forensic Sci. Int.* 2018; 288, 107–114.

32. *Liu C, Jia W, Li T, Hua Z, Qian Z.* Identification and analytical characterization of nine synthetic cathinone derivatives N-ethylhexedrone, 4-Cl-pentedrone, 4-Cl-α-EAPP, propylone, N-ethylnorpentylone, 6-MeO-bk-MDMA, α-PiHP, 4-Cl-α-PHP, and 4-F-α-PHP. Drug Test. Anal. 2017; 9(8), 1162–1171.

33. *López-Arnau R, Martínez-Clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J.* Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives : butylone , mephedrone and methylone. Br. J. Pharmacol. 2012; 167, 407–420.

34. *Manier SK, Richter LHJ, Schäper J, Maurer HH, Meyer MR.* Different in vitro and in vivo tools for elucidating the human metabolism of alpha-cathinone-derived drugs of abuse. Drug Test.

Anal. 2018; 10(7), 1119-1130.

35. *Martínez Clemente J, López-Arnau R, Carbó M, Pubill D, Camarasa J, Escubedo E.* Mephedrone pharmacokinetics after intravenous and oral administration in rats : relation to pharmacodynamics . Psychopharmacology (Berl). 2013; 229(2), 295–306.

36. *Merli D, Zamboni D, Protti S, Pesavento M, Profumo A.* Electrochemistry and analytical determination of lysergic acid diethylamide (LSD) via adsorptive stripping voltammetry. Talanta. 2014; 130, 456–461.

37. *Meyer MR, Maurer HH.* Metabolism of Designer Drugs of Abuse : An Updated Review. Curr. Drug Metab. 2010; 11(5), 468–482.

38. *Meyer MR, Wilhelm J, Peters FT, Maurer HH.* Beta-keto amphetamines : studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone , butylone , and methylone in urine using gas chromatography – mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 2010; 397(3), 1225–1233.

39. *Namera A, Konuma K, Kawamura M, Saito T, Nakamoto A, Yahata M, Ohta S, Miyazaki S, Shiraishi H, Nagao M.* Time-course profile of urinary excretion of intravenously administered α-pyrrolidinovalerophenone and α-pyrrolidinobutiophenone in a human. Forensic Toxicol. 2013; 32(1), 68–74.

40. *Nóbrega L, Dinis-Oliveira RJ.* The synthetic cathinone α-pyrrolidinovalerophenone (α-PVP): pharmacokinetic and pharmacodynamic clinical and forensic aspects. Drug Metab. Rev. 2018; 50(2), 125–139.

41. *ODC.* Sistema de alertas tempranas: Aparición de nuevas sustancias psicoactivas en Colombia, Enero de 2017. Bogotá D.C., Colombia, 2017.

42. *ODC.* Sistema de alertas tempranas: Aparición de nuevas sustancias psicoactivas en Colombia, Septiembre de 2017. Bogotá D.C., Colombia, 2017b.

43. *Oiye ÉN, Figueiredo NB, Andrade JF, Tristão HM, Oliveira MF.* Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a cobalt hexacyanoferrate film-modified electrode. Forensic Sci. Int. 2009; 192(1–3), 94–97.

44. *Oiye ÉN, Katayama JM, Ribeiro MF, De Oliveira MF.* Electrochemical analysis of 25H-NBOMe by Square Wave Voltammetry. Forensic Chem. 2017; *5*, 86–90.

45. *Olesti E, Farré M, Carbó ML, Papaseit E, Perez-Mañá C, Torrens M, Yubero-Lahoz S, Pujadas M, Pozo OJ, De la Torre R.* Dose-Response Pharmacological Study of Mephedrone and Its Metabolites: Pharmacokinetics, Serotoninergic Effects, and Impact of CYP2D6 Genetic Variation. Clin. Pharmacol. Ther. 2019; 106(3), 596-604.

46. *Papaseit E, Pérez-Mañá C, Mateus JA, Pujadas M, Fonseca F, Torrens M, Olesti E, De la Torre R, Farre M.* Human pharmacology of mephedrone in comparison with MDMA. Neuropsychopharmacology. 2016; 41(11), 2704–2713.

47. *Pedersen AJ, Petersen TH, Linnet K.* In vitro metabolism and pharmacokinetic studies on methylone. Drug Metab. Dispos. 2013; 41(6), 1247–1255.

48. *Prosser JM, Nelson LS.* The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. J. Med. Toxicol. 2012; 8(1), 33–42.

49. *Razavipanah I, Alipour E, Deiminiat B, Rounaghi GH.* A novel electrochemical imprinted sensor for ultrasensitive detection of the new psychoactive substance "Mephedrone". Biosens. Bioelectron. 2018; 119, 163–169.

50. *Rickli A, Hoener MC, Liechti ME.* Monoamine transporter and receptor interaction profiles of novel psychoactive substances: Para-halogenated amphetamines and pyrovalerone cathinones. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2015; 25(3), 365–376.

51. *Riley AL, Nelson KH, To P, López-Arnau R, Xu P, Wang D, Wang Y, Shen H, Kuhn DM, Angoa-Perez M, Anneken JH; Muskiewicz A, Hall FS.* Abuse potential and toxicity of the synthetic cathinones (i . e ., " Bath salts "). Neurosci. Biobehav. Rev. 2020; 110, 150-173.

52. *Sánchez-González J, Odoardi S, Bermejo AM, Bermejo–Barrera P, Romolo FS, Moreda–Piñeiro A, Strano-Rossi S.* HPLC-MS/MS combined with membrane-protected molecularly imprinted polymer micro-solid-phase extraction for synthetic cathinones monitoring in urine. Drug Test. Anal. 2019; 11(1), 33–44.

53. *Scheel GL, De Oliveira FM, De Oliveira LLG, Medeiros RA, Nascentes CC, Teixeira CR.* Feasibility study of ethylone determination in seized samples using boron-doped diamond electrode associated with solid phase extraction. Sens. Actuators B Chem. 2018; 259, 1113–1122.

54. *Silva EA, Martínez JA.* Antecedentes del estudio metabólico de MDPV y metilona. Propuesta de un modelo de biotransformación a través de hongos del género Cunninghamella. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2016; 45(3), 484–502.

55. *Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME.* Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. Br. J. Pharmacol. 2013; 168(2), 458–470.

56. *Smith JP, Metters JP, Irving C, Sutcliffe OB, Banks CE.* Forensic electrochemistry: the electroanalytical sensing of synthetic cathinone-derivatives and their accompanying adulterants in "legal high" products. Analyst. 2014; 139(2), 389–400.

57. *Smith JP, Metters JP, Khreit OIG, Sutcliffe OB, Banks CE.* Forensic electrochemistry applied to the sensing of new psychoactive substances: Electroanalytical sensing of synthetic cathinones and analytical validation in the quantification of seized street samples. Anal. Chem. 2014 b; 86(19), 9985–9992.

58. *Souza GA, Arantes LC, Guedes TJ, De Oliveira AC, Marinho PA, Muñoz RAA, Dos Santos WTP.* Voltammetric signatures of 2,5-dimethoxy-N-(2-methoxybenzyl) phenethylamines on boron-doped diamond electrodes: Detection in blotting paper samples. Electrochem. Commun. 2017; 82, 121–124.

59. *Strano-Rossi S, Cadwallader AB, De la Torre X, Botré F.* Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypyrovalerone (MPDV) by gas chromatography / mass spectrometry and liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010; 24(18), 2706–2714.

60. *Švorc Ľ, Vojs M, Michniak P, Marton M, Rievaj M, Bustin D.* Electrochemical behavior of methamphetamine and its voltammetric determination in biological samples using self-assembled boron-doped diamond electrode. J. Electroanal. Chem. 2014; 717–718, 34–40.

61. *Tadini MC, Balbino MA, Eleoterio IC, De Oliveira LS, Dias LG, Demets GJ, De Oliveira MF.* Developing electrodes chemically modified with cucurbit[6]uril to detect 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) by voltammetry. Electrochim. Acta. 2014; 121, 188–193.

62. *Tan F, Smith JP, Sutcliffe OB, Banks CE.* Regal electrochemistry : sensing of the synthetic cathinone class of new psychoactive substances. Anal. Methods. 2015; 7, 6470–6474.

63. *Tremeau-Cayel L, Carnes S, Schanfield MS, Lurie IS.* A comparison of single quadrupole mass detection and diode array ultraviolet detection interfaced to ultra - high performance supercritical

chromatography for the quantitative analysis of synthetic cathinones. J. Chromatogr. B. 2018; 1091, 96–100.

64. *Tyrkko E, Andersson M, Kronstrand R.* The toxicology of new psychoactive substances: Synthetic cathinones and phenylethylamines. Ther. Drug Monit. 2016; 38(2), 190–216.

65. *UNODC.* World Drug Report 2019. Stimulants. Viena, Austria, 2019.

66. *Valente MJ, Guedes de Pinho P, de Lourdes Bastos M, Carvalho F, Carvalho M.* Khat and synthetic cathinones : a review. Arch. Toxicol. 2014; 88, 15–45.

67. *Valento M, Lebin J.* Emerging Drugs of Abuse: Synthetic Cannabinoids, Phenylethylamines (2C Drugs), and Synthetic Cathinones. Clin. Pediatr. Emerg. Med. 2017; 18(3), 203–211.

68. *Vignali C, Moretti M, Groppi A, Osculati AMM, Tajana L, Morini L.* Distribution of the synthetic cathinone α-pyrrolidinohexiophenone in biological specimens. J. Anal. Toxicol. 2019; 43(1), 1–6.

69. *Waddell SA, Fernandez C, Inverarity CC, Prabhu R.* Extending the capability of forensic electrochemistry to the novel psychoactive substance benzylpiperazine. Sens. Bio-Sens. Res. 2017; *13*, 28–39.

70. *Wang, J.* Analytical electrochemistry . 3rd. ed. Hoboken, New Jersey: John Woley & Sons, Inc; 2006.

71. *Zang D, Yan M, Ge S, Ge L, Yu J.* A disposable simultaneous electrochemical sensor array based on a molecularly imprinted film at a NH2-graphene modified screen-printed electrode for determination of psychotropic drugs. Analyst. 2013; 138(9), 2704–2711.

72. *Zuway KY, Smith JP, Foster CW, Kapur N, Banks CE, Sutcliffe OB.* Detection and quantification of new psychoactive substances (NPSs) within the evolved “legal high” product, NRG-2, using high performance liquid chromatography-amperometric detection (HPLC-AD). Analyst. 2015; 140(18), 6283–6294.

Un analisis de imagen por segmentación de la histopatología producida por la acrilamida en el pez cebra adulto (*Danio rerio*)

***Hernández C., Álvarez M* [*1].**

[1]Laboratorio de Microscopia, Instituto Anatómico "José Izquierdo" Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, Caracas-República Bolivariana de Venezuela.1012.

Resumen: Los sistemas de análisis de imágenes han permitido la implementación de técnicas de histomorfometría para cuantificar con precisión las irregularidades arquitectónicas y la complejidad de las estructuras histológicas en condiciones normales, así como en situaciones de daño tisular inducido. El objetivo del trabajo fue cuantificar los efectos histológicos producidos por la acrilamida en el modelo de vertebrado *Danio rerio* adulto expuesto durante 8 días a la concentración de 0.85 mM de un alqueno como la acrilamida. Se aplico un proceso de segmentación de imagenes a través del programa de dominio público ImageJ. Fiji, sobre preparaciones histológicas de tejido renal, intestinal y hepático, aplicando umbrales de intensidad y diseñando contornos alrededor de las áreas de interés ubicadas en imágenes mascaras binarias de 8-bit. Esta fue obtenida a partir de la transformación de la imagen original contrastada con hematoxilina y eosina. Los datos obtenidos fueron incorporados al programa estadístico GraphPad Prims. 7 para su cuantificación y representación gráfica. Los espacios internos de las Capsulas de Bowman en el tejido renal registraron un mayor tamaño promedio en comparación con el tejido control, mientras que en el tejido intestinal se registraron vacuolas citoplasmáticas de mayor tamaño promedio en comparación a las vacuolas registradas en el tejido hepático, con un valor de ****p<0,0001, altamente significativo en contraste con los respectivos controles. Concluimos que con la segmentación fue posible caracterizar a la histopatología inducida por la acrilamida como un efecto tejido-dependiente, resultando más sensible el tejido renal y el intestinal en comparación con el tejido hepático.

Palabras claves: Analisis de imagen, segmentación, acrilamida, toxicidad diferencial, pez cebra

Abstract: ***An image analysis by segmentation of histopathology produced by acrylamide in the adult zebrafish (Danio rerio)***

Image analysis systems have allowed the implementation of histomorphometry techniques to precisely quantify architectural irregularities and the complexity of histological structures in normal conditions, as well as in situations of induced tissue damage. The aim of this work was to quantify the histological effects produced by acrylamide in the vertebrate model *Danio rerio* adults exposed for 8 days to the concentration of 0.85 mM of an alkene such as acrylamide. Segmentation was performed on histological preparations of renal, intestinal and hepatic tissue, through the use of the public domain program ImageJ Fiji, applying intensity thresholds and designing contours around the areas of interest located in binary 8-bit mask images. This was obtained from the transformation of the original image contrasted with hematoxylin and eosin. The data obtained were incorporated into the GraphPad Prims statistical program 7 for quantification and graphic representation. The internal spaces of the Bowman Capsules in the renal tissue registered a larger average size compared to the control tissue, while in the intestinal tissue cytoplasmic vacuoles of larger average size were recorded compared to the vacuoles recorded in the liver tissue , with a value of ****p <0,0001, highly significant in contrast to the respective controls. We conclude that with segmentation it was possible to characterize the histopathology acrylamide-induced as a tissue-dependent effect, with renal and intestinal tissue being more sensitive compared to liver tissue.

Keywords: Image analysis, segmentation, acrylamide, differential toxicity, zebrafish.

*e-mail: alvarezmenator@gmail.com

Introducción

La histopatología como campo de investigación se ha ido enriqueciendo con la incorporacion de los sistemas automatizados de analisis de imágenes de células y tejidos, lo que ha incrementado la atención y la conciencia de que la patología científica y el diagnóstico requieren de enfoques novedosos para realizar análisis cuantitativos (Griffin y Treanor, 2017; Aeffner et al, 2019). Los sistemas de analisis de imágenes han permitido incorporar tecnicas de histomorfometría para cuantificar con precisión las irregularidades arquitectónicas y la complejidad de las estructuras histológicas en condiciones normales, así como en situaciones de daño tisular inducido (Wienert et al, 2012). Así, la expresión numérica de la arquitectura nuclear y/o citoplasmática, ha proporcionado una mejor información para comprender a los sistemas biológicos, así como también conocer la posible progresión de algunas patologías a través de suministrar resultados cuantitativos y un valor agregado al analisis cualitativo de la clásica caracterización histológica manual (Xing F et al, 2019). El objetivo del trabajo fue realizar un analisis de imagen por segmentación de la histopatología en peces cebra adultos (*Danio rerio*) sometidos durante 8 días a la concentración de 0.85 mM de un alqueno tipo-2 como la acrilamida (ACR). La ACR, es un agente químico de procesado (Masson et al, 2007), altamente toxico (Hernández et al, 2019., Lopachin , 2012), por lo que en las últimas décadas ha sido considerada como un agente contaminante de alto riesgo y un verdadero problema de Salud Publica, ya que su presencia en productos de consumo alimenticio masivo, ya ha sido reportada (Semla et al, 2017); sin embargo, la cuantificación de las señales de su toxicidad a nivel de la microarquitectura tisular inducidas por este agente en modelos experimentales, hasta donde se conoce ha sido poco considerada. Cabe destacar que el pez cebra (*Danio rerio*) es un teleósteo de pequeño tamaño, natural de las regiones tropicales y con una alta homología genómica con el humano (Goldsmith y Jobin, 2012). Esta característica, particularmente a nivel de tejidos como el renal, el intestinal y el hepático, entre otros, hacen que el pez cebra sea un modelo atractivo y prometedor para múltiples bioensayos debido a la facilidad de manejo y la relación costo-beneficio en comparación con otros modelos de experimentación (Cornet et al, 2017). La susceptibilidad de los tejidos en cuestión a la acción de agentes tóxicos, ha hecho que el pez cebra adulto sea utilizado para pruebas de toxicidad-protección con agentes naturales como posibles candidatos fármacos hematoprotectores (Alvarez et al, 2017a; Alvarez et al, 2017b).

Materiales y metodos

Obtención y preparación de los peces.

Los peces cebra adultos de cepa silvestre (wt) fueron obtenidos de alevines desarrollados y mantenidos bajo patrones adaptados a las condiciones del laboratorio de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo", de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Los peces fueron acondicionados en acuarios de vidrio de 120 cm de largo, 50 cm de profundidad y 30 cm de alto, provisto de filtro interno de carbón activado y un aireador para la oxigenación del agua, a temperatura de 26°C y pH 7,2, y alimentados, tres veces al día, con alimento en hojuelas para peces (Kantal S.A. Venezuela).

Tratamiento Acrilamida.

Los bioensayos se realizaron por triplicado. Grupos de 7 peces adultos fueron sometidos durante 8 días a una concentración toxica de ACR de 0,85 mM, estimada previamente. Cabe destacar que la concentración de 0,85 mM ha sido obtenida a partir de una concentración madre de 7 mM

incluida por otros autores (Komoike y Matsuoka, 2019) dentro del rango de toxicidad de la ACR y generadora de adupto de hemoglobina. Luego de una serie de ensayos con distintas concentraciones en un rango entre 0.21 mM y 7 mM se obtuvo como CT_{50} = 0, 85 ±0,18 mM. Transcurrido el tiempo de tratamiento, los peces fueron sacrificados de acuerdo a las normas del comité de bioética de la institución y siguiendo anotaciones de otros autores (Monte y Zoltán, 2012).

Procesamiento de muestras.

Los diferentes órganos, particularmente riñón, intestino e hígado, fueron extraídos y fijados en paraformaldehido frío al 4% durante 24 horas y procesados para ser incluidos en parafina. Los respectivos bloques de las muestras, controles y tratadas con ACR, fueron cortadas en secciones histológicas de 5µm, para ser sometidas a las tinciones con Hematoxilina y Eosina.

Adquisición de las imágenes

Las imágenes digitales de los cortes histológicos seriados de muestras controles y tratadas con ACR, fueron adquiridas a través de un sistema de captura digital, Capture IC.22. Imaging Sourse, incorporado a un Microscopio Olympus BX50, bajo objetivo 10x y 100x de inmersión en número de 5 cinco imágenes por corte.

Segmentación

El procesamiento de segmentación utilizado consistió en la aplicación del umbral de color a la imagen original teñida con hematoxilina y eosina, para luego realizar la transformación del producto obtenido, en una imagen binaria de 8-bit, blancos-grises-negro, o mascara. Sobre esta imagen binaria se delimitaron las regiones de interés; particularmente; el Espacio de la Capsula de Bowman (ECB), en el tejido renal, así como las regiones correspondientes a los espacios vacuolares en el tejido intestinal y hepático. Esto fue realizado a través de la definición de bordes o contornos alrededor de estas áreas, mediante el uso de gradientes de escala de grises, aplicando umbrales de intensidad de pixeles, para luego estimar el Área Media del Espacio de la Cámara de Bowman (AMECB) y el Área Vacuolar Media (AVM). Para todo ello se procedió a través del menú del programa ImageJ Fiji. Los datos numéricos en μm^2 fueron obtenidos y analizados con un test no paramétrico y fueron representados en una gráfica de media geométrica de eje lineal de acuerdo al Programa estadístico GraphPad Prism 7.0.

Resultados

El contraste entre las imágenes binarias de los distintos tejidos renal, intestinal y hepático control (Fig.1A, 1B, 1C) y los respectivos tratados con ACR (Fig.1A', 1B' y 1C'), puso en evidencia, un significativo incremento en los ECP, en el tejido renal, así como un incremento de vacuolización en el tejido intestinal y el hepático. La selección por contorno de las áreas de interés en el tejido renal, delimitada por el contorno de fuertes líneas rojas en la denominada mascara de la imagen original (Fig.2A), permitió cuantificar la mayor área entre los ECB, al comparar los valores de AMECB de los controles y tratados (Fig.2A'), con diferencias cuantitativas y altamente significativas ****p<0,0001. Por su parte, la selección de las áreas de interés en tejido intestinal, delimitada igualmente por el contorno de fuertes líneas rojas en la denominada mascara de la imagen original (Fig.3B), permitió mostrar una mayor presencia de vacuolas citoplasmáticas en la región de los enterocitos de las vellosidades de dicho tejido al contrastar los valores de AMV de controles y tratados (Fig.3B'), con diferencias cuantitativas e igualmente estadísticamente significativas ****p<0,0001. Finalmente, la selección de las áreas de interés en el tejido hepático, visualizada en la denominada mascara de la imagen original (Fig.4C), permitió mostrar una mayor presencia de vacuolas citoplasmáticas en dicho tejido al comparar los valores de AMV control y tratado (Fig.4C'), con diferencias cuantitativas e igualmente altamente significativas ****p<0,0001.

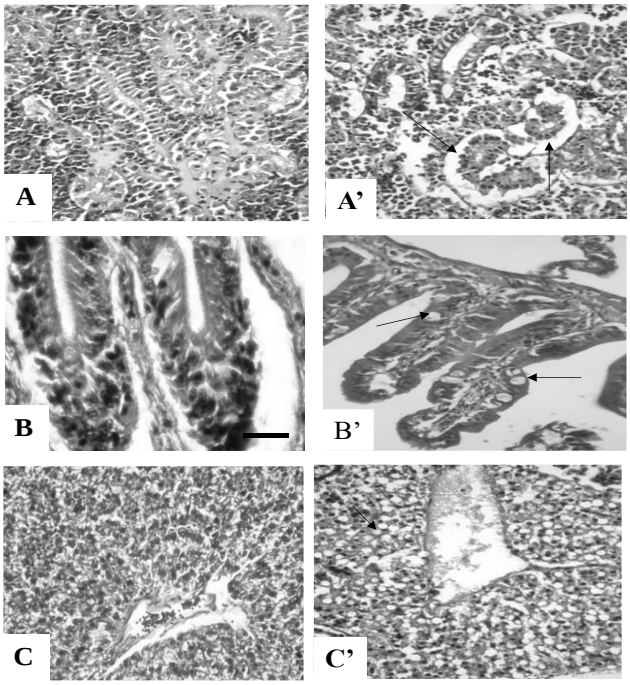


Figura 1: Imágenes transformadas 8-bit de cortes de tejido renal, intestinal y hepático de pez cebra adulto controles (A; B; C) y tratados con ACR (A', B', C'). Las imágenes originales teñidas con H&E. Se destaca en riñón mayor espacio de la Capsula de Bowman (ECB) (flechas), así como gran presencia de vacuolas en los tejidos intestinal y hepático (flechas). Barra = 1,45 µm.

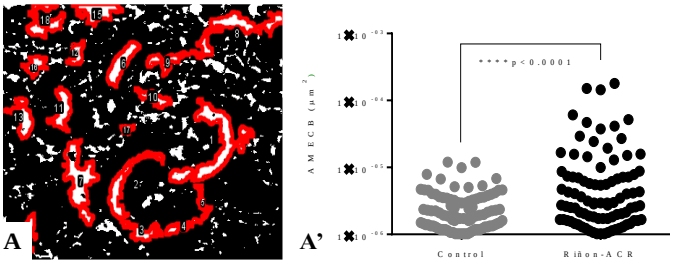


Figura 2: Segmentación y delimitación de contornos de los espacios de la Capsula de Bowman (ECB) en el tejido hepático tratado con ACR. Mascara del corte original (A). Cuantificación del Área Media de los ECB (A').

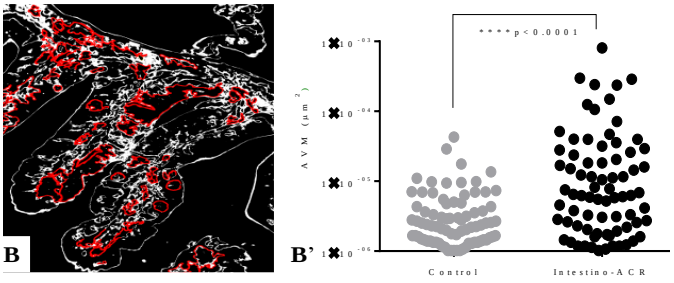


Figura 3: Segmentación y delimitación de contornos de vacuolas en el tejido intestinal de pez cebra adulto tratado con ACR Mascara del corte original (B Cuantificación significativa de las diferencias del Área Vacuolar Media (AMEV) (B').

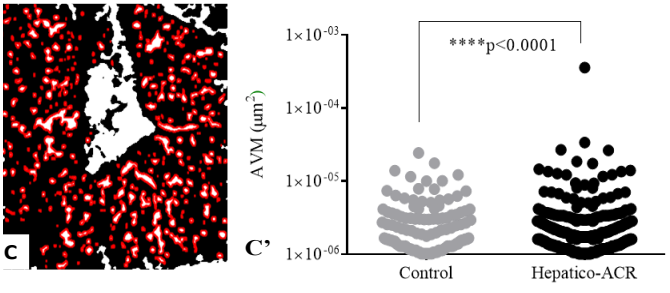


Figura 4: Segmentación y delimitación de contornos de vacuolas en el tejido hepático de pez cebra adulto tratado con ACR Mascara del corte original (C). Cuantificación significativa de las diferencias del Área Vacuolar Media (AMEV) (C').

Discusion

Con los datos obtenidos en este estudio se puso en evidencia que efectivamente la acrilamida causa efectos adversos en los tejidos analizados; renal, intestinal y hepático de pez cebra adulto, demostrado principalmente a través de la evidente perdida de la microarquitectura de estos tejidos, probablemente debido a un aumento significativo de la peroxidación lipídica, disminución de los niveles de glutatión y disminución de las actividades de la catalasa y la superóxido dismutasa, principales mecanismos de acción de la acrilamida que han sido reportados por otros autores (Mohamed, 2012). Sin embargo, no solo se verifico la acción toxica de la acrilamida sobre estos tejidos particulares, sino que la cuantificación del daño tisular, obtenida a través del analisis de imágenes binaria en escala de grises, aporto un valor agregado al analisis cualitativo. Esto a través de la incorporacion de datos numéricos, con cifras estadísticamente significativas, que permitieron establecer la expresión; AMECB-Riñón >AVM-Intestino >AVM-Hígado. De dicha expresión, se pudo concluir que el daño tisular ejercido por la ACR podria ser un efecto toxico con características de tejido-dependiente, estableciéndose así que los tejidos renal y hepático podrían ser caracterizados como los tejidos con una mayor sensibilidad hacia la acción de la ACR, en comparación con el tejido hepático; la existencia de tejidos con una mayor o menor sensibilidad a la ACR, hace posible establecer características que hasta donde conocemos no habían sido claramente definidas. Por otra parte, cabe destacar que el proceso de segmentación utilizado como protocolo para el análisis de imágenes, resulto un método simple para la cuantificación de cambios en la microarquitectura tisular, utilizando solo la denominada "imagen mascara" correspondiente a la expresión de una huella de la imagen original, con una alta precisión y validación como ha sido reportado en otros estudios histopatologicos (Xu J et al, 2011). Dicho proceso de segmentación, ha sido caracterizado como una de las etapas de relevancia en el análisis de imágenes de microscopía, ya que permite colocar las áreas de interés en un primer plano, diferenciándolas de las regiones de bajo interés, que quedan incrustadas en zonas de píxeles de fondo. Este umbral de intensidad de píxeles es definido automáticamente mediante la función de umbral del software de código abierto ImageJ Fiji, que utiliza información mínima y detecta las regiones de interés independientemente de su forma (Russell RA, 2009). Dicha característica permite la aplicación de este procedimiento de segmentación en un amplio espectro de estructuras histológicas en condiciones normales, así como en condiciones de daño tisular inducido, ya que evita el sesgo de la segmentación independiente de las características de la forma. En este contexto cabe destacar que la segmentación de las imágenes digitales de los tejidos analizados de pez cebra adulto, permitió incorporar datos cuantitativos como un valor agregado al analisis cualitativo del daño tisular inducido por la ACR Con dicha incorporacion se podria establecer un posible índice del grado histopatológico para la acción de este alqueno tipo-2, con el cual poder realizar un seguimiento progresivo de la toxicidad de este importante agente químico de procesado.

Agradecimientos

A la Licenciada Lourdes Perdomo por el trabajo de histotecnologia realizado. Al Dr. Alexis Rodríguez Acosta y a la Licenciada Amanda Alvarez por la revisión del texto.

Bibliografia

1. *Aeffner, F., Zarella, M. D., Buchbinder, N., Bui, M. M., Goodman, M. R., Hartman, D. J., Lujan, G. M., Molani, M. A., Parwani, A. V., Lillard, K., Turner, O. C., Vemuri, V., Yuil-Valdes, A. G., & Bowman, D.* Introduction to Digital Image Analysis in Whole-slide Imaging: J Pathol Inform. 2019; Vol 24 (10):15-20.

2. *Alvarez M, Guadarrama R, Arias M, Perdomo L, Navarro.* Interacción fluoruro de sodio con Moringa oleífera en sangre periférica de pez cebra Danio rerio. RETEL. 2017a; Vol 49: 38-49.

3. *Álvarez M, Vanessa G, Arias M, Perdomo L, Navarro. Acrilamida* y Amaranthus dubius L en células sanguíneas de pez cebra Danio rerio. RETEL. 2017b; Vol 49: 28-37

4. *Cornet C, Calzolari S, Miñana-Prieto R, Dyballa S, van Doornmalen E, Rutjes H, Savy T, D'Amico D, Terriente J. Ze* GlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. Int J Mol Sci. 2017; Vol 18 (4):864-882.

5. *Goldsmith JR, Jobin C.* Think small: zebrafish as a model system of human pathology. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:817341.

6. *Griffin J, Treanor D*. Digital pathology in clinical use: where are we now and what is holding us back? Histopathology. 2017; Vol 70 (1):134–145.

7. *Hernández, C, Álvarez, M, Perdomo, L, Rodríguez-Acosta*. Hemotoxicity activity caused by acrylamide on the peripheral erythrocytes of Zebrafish (*Danio rerio*). RETEL. 2019; Vol 59: 64-75.

8. *Komoike, Yuta, and Masato Matsuoka*. "In vitro and in vivo studies of oxidative stress responses against acrylamide toxicity in zebrafish." Journal of hazardous materials. 2019; Vol. 365: 430-439.

9. *LoPachin RM, Gavin T.* Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. Environ Health Perspect. 2012; Vol 120 (12):1650–1657.

10. *Stephen J. Powers, Donald S. Mottram, Andrew Curtis & Nigel G. Halford.* Acrylamide levels in potato crisps in Europe from 2002 to 2016. Food Additives & Contaminants: Part A. 2017; Vol 34 (12): 2085–2100.

11. *Mohamed Sadek K.* Antioxidant and immunostimulant effect of Carica papaya linn. Aqueous extract in acrylamide intoxicated rats. Acta Inform Med. 2012; Vol 20 (3):180–185.

12. *Matthews M, Varga ZM.* Anesthesia and Euthanasia in zebrafish. ILAR J. 2012; Vol 53 (2):192-204.

13. *Russell RA, Adams NM, Stephens DA, Batty E., Jensen K., Freemont PS* Segmentación de imágenes de microscopía de fluorescencia para el análisis cuantitativo de la arquitectura nuclear celular. Biophys J. 2009; Vol 96: 3379–3389.

14. *Semla M, Goc Z, Martiniaková M, Omelka R, Formicki G.* Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health. Physiol Res. 2017; Vol 66 (2):205–217.

15. *Wienert S, Heim D, Saeger K, Stenzinger A, Beil M, Hufnagl P, Dietel M, Denkert C, Klauschen F.* Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach. Sci Rep. 2012; Vol 2: 503-509

16. *Xing F, Xie Y, Shi X, Chen P, Zhang Z, Yang L.* Towards pixel-to-pixel deep nucleus detection in microscopy images. BMC Bioinformatics. 2019; Vol 20 (1):472-484.

17. *Xu J, Janowczyk A, Chandran S, Madabhushi A.* A high-throughput active contour scheme for segmentation of histopathological imagery. Med Imagen Anal. 2011; Vol 15 (6):851–862.

Características de las intoxicaciones agudas en pacientes ancianos según la edad

Béjar Calzada CM[1], Pi-Figueres Valls M[2,3,4], Clemente Rodríguez C[2,3], PallàsVillaronga O[3,5], Arnau Barrés I[2,3,4], Calpe Perarnau X[3,4,] Cirera Lorenzo I[3,5,6,7], Supervía Caparrós A[3,5,6,7].

1Institut de Neuropsiquiatria i Adiccions, Centre Assistencial Dr. Emili Mira, Parc de Salut Mar (PSM), Barcelona.
2Servei de Geriatria. Hospital Universitari del Mar, PSM, Barcelona.
3Unitat Funcional de Toxicologia. Hospital Universitari del Mar, PSM, Barcelona.
4Grup de treball de Toxicologia de la SoCMUE (SoCMUETox).
5Servei de Urgències. Hospital Universitari del Mar, PSM, Barcelona.
6Universitat Autònoma de Barcelona.
7Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques. Barcelona.

Resumen: *Introducción***:** Con el aumento en la esperanza de vida, es de esperar un incremento en el número de intoxicaciones agudas en pacientes ancianos. Los objetivos del estudio son analizar las características de las intoxicaciones en >65años e identificar diferencias según la edad. *Metodología***:** Estudio retrospectivo comparativo en pacientes ancianos divididos en 3 grupos: 1 (66-75años), 2 (76-85años) y 3 (>85años), atendidos en Urgencias de un Hospital Universitario, por intoxicación aguda, del 2009-2014. *Resultados***:** Se recogieron 341 intoxicaciones en pacientes >65años (8,9% del total de intoxicados). Edad media: 78,9(7,7)**.** Grupo 1: predominaron los varones (63,6% vs 28,1% y 20%; p<0,001). Grupos 2 y 3: se intoxicaron más frecuentemente en domicilio (93,5% y 97,1% vs 58,5%; p<0,001), de manera accidental (77,1% y 97,0% vs 34,7%; p<0,001); mayoría por fármacos (73,9% y 85,7%) y precisaron menor contención mecánica (p<0,006). *Conclusiones:* Las intoxicaciones son más frecuentes en pacientes de entre 76-85 años, en los grupos 2 y 3 la mayoría son mujeres, accidentales, en domicilio y debidas a fármacos.

Abstract: ***Characteristics of acute poisonings in elderly patients according to age***

*Background and objective***:** With the increase in life expectancy, an increase in the number of acute poisonings in elderly patients is expected. The aims of this study are to analyze the characteristics of the poisonings in patients over 65 years and identify the differences according to age. *Methods***:** Comparative retrospective study in elderly patients divided into Group 1: (66-75 years), group 2: (76-85 years) and group 3: (>85 years), treated in the Emergency Department of a University Hospital for acute intoxication during a period of 6 years. *Results*: 341 poisonings were collected in patients over 65 years (8.9% of all acute poisonings). Average age: 78.9 (7.7). In group 1, males predominated (63.6% vs. 28.1% and 20%; p <0.001). Groups 2 and 3 were more frequently intoxicated at home (93.5% and 97.1% vs. 58.5%; p <0.001), accidentally (77.1% and 97.0% vs. 34.7%; p <0.001); with greater involvement of drugs (73.9% and 85.7%) and required less mechanical containment (p <0.006). *Conclusions***:** Poisonings are more frequent in patients between 76-85 years, in groups 2 and 3 the majority are women, accidental, at home and due to drugs.

Introducción

Las intoxicaciones agudas (IA) representan un importante problema de salud a nivel mundial produciendo una morbimortalidad significativa[1,2]. Se estima que el 1% de las asistencias en los Servicios de Urgencias hospitalarias (SUH) [3] se deben a IA y que del 2% al 10,5% se producen en pacientes >65 años (>65a) [1,4]. Dadas las características especiales de esta edad, las IA pueden tener mayor dificultad diagnóstica[5,6], provocando hospitalizaciones hasta en el 25,5% de los casos y una mortalidad de hasta el 11,8%[7].

La OMS estima un aumento mundial de casi el doble de la población >60a para el año 2050[8]. Esto puede suponer un incremento en el número de intoxicaciones en esta población.

Se han descrito diferencias en las características de las intoxicaciones en función del sexo[7,9,10], la procedencia[11] o la edad[12]. El objetivo de este trabajo es evaluar las características de las IA atendidas en un SUH en pacientes >65a divididos en grupos etarios.

Métodos

Estudio descriptivo, retrospectivo y comparativo de todas las IA en >65a atendidas en un SUH universitario desde el 1 de enero de 2009 hasta el 31 de diciembre de 2014. Los datos se obtuvieron a través de la revisión de las historias clínicas correspondientes. Variables registradas: edad, sexo, lugar de la intoxicación (domicilio/vía pública), iniciativa de la asistencia (Servicio de emergencias médicas [SEM], propios medios, otros), intención (recreativa/suicida/homicida/involuntaria-accidental), existencia de antecedentes psiquiátricos y/o intoxicaciones previas, tóxico/s implicado/s (alcohol/drogas de abuso/fármacos/gases/productos domésticos), síntomas, tratamiento, realización de valoración psiquiátrica y comunicado judicial previo al alta, destino al alta y mortalidad.

La muestra se dividió en tres grupos: el grupo 1 incluyó pacientes de 66-75años; el grupo 2 de 76-85 años; y el grupo 3 >85a.

Para comparar las variables cuantitativas se utilizó la prueba de la t de Student o de la U de Mann-Whitney, y para las cualitativas, la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Fisher; siendo estadísticamente significativo un valor de p<0,05. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para el análisis de datos se utilizó SPSS 15.0.

Resultados

Durante el periodo de estudio se registraron 3.847 IA, de las cuales, 341 (8,9%) se presentaron en pacientes >65a (media 78,9±7,7 años). Pertenecían al grupo 1: 118 (34,6%) pacientes, al grupo 2: 153 (44,9%) y al grupo 3: 70 (20,5%).

En la **Tabla 1** se muestra que, en el grupo 1 predominaron varones (63,6%) y en los grupos 2 y 3, mujeres (71,9% y 80%, respectivamente) (p< 0,001). La forma más frecuente de acceso al SUH fue a través del SEM (p=no significativa [ns]). La mayoría de los pacientes de los grupos 2 y 3 presentaron intoxicación en domicilio (93,5% y 97,1% vs 58.5%) (p<0,001). En el grupo 1 destaca un porcentaje relativamente similar en domicilio y vía pública (39%). La causa accidental fue responsable en la mayoría de IA de los grupos 2 y 3, comparado con el grupo 1 (77,1% y 85,7% vs 34,7% respectivamente) (p<0,001), en los que existía un mayor porcentaje de IA por intención recreativa (11,1% y 2,9% vs 50,0%) (p<0,001). Los pacientes de los grupos 2 y 3 tuvieron menos antecedente de IA previas (18,3% y 11,4% vs 44%) (p<0,001), y de patología psiquiátrica (34% y 20% vs 50,8%) (p<0,001).

Tal y como se describe en la **Tabla 2**, en los grupos 2 y 3 los fármacos fueron el tóxico más implicado (73,9% y 85,7% vs 43,2%) (p<0,001); la digoxina en ambos grupos más frecuente (34,0% y 42,9% vs 5.1%) (p<0,001). En el grupo 1, las benzodiacepinas fueron la primera causa farmacológica y la segunda en los grupos 2 y 3 (21,2%, 21,6% y 27,1%, respectivamente) (p=ns). Los opiáceos, en tercer lugar (3,4%, 8,5% y 4,3%) (p=ns). El alcohol fue responsable en el 52,5% de casos del grupo 1 vs 13,7% y 1,4% de grupos 2 y 3 (p < 0,001). Las drogas de abuso

*e-mail: 60820@parcdesalutmar.cat

Tabla 1. *Características generales según grupo etario.*

		Grupo 1 66-75 años n (%)	Grupo 2 76-85 años n (%)	Grupo 3 >85 años n (%)	p
Sexo					
	Mujeres	**43 (36,4)**	**110 (71,9)**	**56 (80)**	**<0,001**
	Hombres	**75 (63,6)**	**43 (28,1)**	**14 (20)**	
Procedencia					
	España	111 (94,1)	149 (97,4)	70 (100)	ns
	Extranjero	7 (5,9)	4 (2,6)	0 (0)	
Iniciativa					
	SEM/TS	97 (82,2)	126 (82,4)	60 (85,7)	
	Medios propios	18 (15,3)	19 (12,4)	2 (2,9)	ns
	CAP otro hospital, etc.	3 (2,5)	8 (5,2)	8 (11,4)	
Lugar					
	Domicilio	**69 (58,5)**	**143 (93,5)**	**68 (97,1)**	**<0,001**
	Vía pública	**46 (39,0)**	**7 (4,6)**	**1 (1,4)**	
	Otros	**3 (2,5)**	**3 (1,9)**	**1 (1,5)**	
Intencionalidad					
	Accidental	**41 (34,7)**	**118 (77,1)**	**60 (85,7)**	**<0,001**
	Recreativa	**59 (50,0)**	**17 (11,1)**	**2 (2,9)**	
	Suicida	**17 (14,4)**	**16 (10,5)**	**7 (10)**	
	Homicida/otros	**1 (0,9)**	**2 (1,3)**	**1 (1,4)**	
Ant. Previos:					
-Intoxicaciones	**Si**	**52 (44,0)**	**28 (18,3)**	**8 (11,4)**	**<0,001**
	No ó N/S	**66 (56,0)**	**125 (81,7)**	**62 (88,6)**	
-Psiquiátricos	**Si**	**60 (50,8)**	**52 (34,0)**	**14 (20,0)**	**<0,001**
	No ó N/S	**58 (49,2)**	**101 (66,0)**	**56 (80,0)**	
IC a Psiquiatría	**Si**	**31 (26,3)**	**19 (12,5)**	**7 (10,0)**	**0,007**
	No ó N/S	**87 (73,7)**	**134 (87,5)**	**63 (90,0)**	
Comunicado judicial	Si	13 (11,0)	18 (11,8)	4 (5,7)	ns
	No ó N/S	105 (89,0)	135 (88,2)	66 (94,3)	
Destino al alta	Domicilio	96 (81,4)	109 (71,2)	47 (67,1)	
	Planta convencional	8 (6,8)	31 (20,3)	19 (27,1)	ns
	UCI	2 (1,7)	3 (2,0)	0	
	Psiquiatría	1 (0,8)	0	0	
	Traslado/Otros	11 (9,3)	10 (6,5)	4 (5,8)	
Fugas	**Si**	**6 (5,1)**	**0**	**0**	**0,003**
	No	**118 (94,9)**	**153 (100,0)**	**70 (100,0)**	
Mortalidad	Total	1 (0,8)	3 (2,0)	3 (4,3)	
	Accidental	0	3 (2,0)	2 (2,9)	ns
	Suicida	1 (0,8)	0	1 (1,4)	

SEM/TS: Servicio de emergències médicas/Transporte Sanitario; CAP: Centro de atención primaria; Ant.Pevios: antecedentes previos; N/S: No se sabe. IC: Interconsulta; UCI: Unidad de cuidados intensives.

fueron de baja incidencia, hubo 2 (1,7%) casos por heroína y 1 (0,8%) por anfetaminas en el grupo 1. Respecto a las IA por productos domésticos hubieron 8,5% casos del grupo 1, 4,6% del grupo 2 y 8,6% del grupo 3 (p=ns), destacando la lejía (9 pacientes) y el ácido clorhídrico (3 pacientes). Las intoxicaciones por gases se produjeron con baja frecuencia (grupos 1, 2 y 3: 5,9%, 9,8% y 2,9%, respectivamente) (p=ns); el monóxido de carbono (CO), responsable en la mayoría de los grupos 2 y 3 (p=0,035).

Tabla 2. *Tipos de tóxicos (fármacos, alcohol, drogas de abuso, etc.)*

	Grupo 1 66-75 años n (%)	Grupo 2 76-85 años n (%)	Grupo 3 >85 años n (%)	p
Fármacos	**51 (43,2)**	**113 (73,9)**	**60 (85,7)**	**<0,001**
BDZ	25 (21,2)	33 (21,6)	19 (27,1)	ns
Neurolépticos	6 (5,1)	3 (2,0)	4 (5,7)	ns
Antidepresivos	6 (5,1)	7 (4,6)	4 (5,7)	ns
Litio	2 (1,7)	4 (2,6)	0	ns
Opiáceos	4 (3,4)	13 (8,5)	3 (4,3)	ns
Paracetamol	4 (3,4)	4 (2,6)	2 (2,9)	ns
AINEs	3 (2,5)	4 (2,6)	2 (2,9)	ns
Digoxina	**6 (5,1)**	**52 (34,0)**	**30 (42,9)**	**<0,001**
Otros antiarrítmicos	0	1 (0,7)	0	ns
Betabloquantes	0	2 (1,3)	0	ns
IECAs	1 (0,8)	1 (0,7)	1 (1,4)	ns
Antiepilépticos	3 (2,5)	5 (3,3)	2 (2,9)	ns
ADOs	2 (1,7)	2 (1,3)	3 (4,3)	ns
Alcohol	**62 (52,5)**	**21 (13,7)**	**1 (1,4)**	**<0,001**
DA:				
Anfetaminas	1 (0,8)	0	0	ns
Heroína	2 (1,7)	0	0	
Productos domésticos	10 (8,5)	7 (4,6)	6 (8,6)	ns
Intoxicación por gases	**7 (5,9)**	**15 (9,8)**	**2 (2,9)**	**0,035**

BDZ: Benzodiacepinas; AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos; IECAs: Inhibidores de la enzima conversora de la angiotensina; ADOs: Antidiabéticos orales; DA: Drogas de abuso.

Se evidenció sintomatología en el 90,6% de todos los casos de IA (p=ns). La **Figura 1**, muestra que los síntomas más frecuentes, en los tres grupos, fueron los neurológicos (76 casos [64,4%], 90 [58,8%] y 40 [57,1%] respectivamente) (p=ns). Se encontraron diferencias significativas en síntomas digestivos (18 casos [15,3%], 50 [32,7]% y 27 [38,6%], respectivamente) (p<0,001), alteraciones conductuales (23 pacientes [19,5%], 16 [10,5%], y 4 [5,7%], respectivamente) (p=0,013) y cardiovasculares (12 [10,2%], 31 [20,3%] y 14 [20,0%]) (p= 0,046).

En la **Tabla 3**, se detalla que el tratamiento se precisó en 64,4%, 74,5% y 85,7% de grupos 1, 2 y 3 respectivamente (p<0,02); el más utilizado: el soporte inespecífico. Un bajo porcentaje de pacientes necesitaron soporte vital avanzado y ventilación mecánica no invasiva en los tres grupos (0,8%, 2,0%, 1,4% y 1,7%, 0,7%, 0,0%, respectivamente). Se administró algún tipo de antídoto en 9 (7,6%) casos del grupo 1, 22 (14,4%) del 2 y 15 (21,4%) del 3 (p=0,025); por orden de frecuencia: Flumazenil (5,1%, 10,5% y 18,6%, respectivamente) (p=0,013), Naloxona (1,7%, 3,3% y 0%, respectivamente) (p=ns) y N-Acetilcisteína (0,8%, 1,3% y 2,9% respectivamente) (p=ns). En 1 caso del grupo 2 se utilizó flumazenil y naloxona. La descontaminación gástrica (aspiración/carbón-activado), las soluciones ácidas/alcalinas, la depuración renal o la cámara hiperbárica, fueron utilizadas en bajos porcentajes (p=ns). Precisó contención mecánica el 5,9% de pacientes del grupo 1, el 0,7% del grupo 2 y ninguno del grupo 3 (p=0,006).

En la **Tabla 1**, se describe que la valoración psiquiátrica de urgencias fue requerida en el 26,3%, 12,5% y 10,0% de los casos, grupos 1, 2 y 3 (p=0,007). El comunicado judicial se realizó con escasa frecuencia en los tres grupos (p=ns). La mayoría de los pacientes de los tres grupos pudieron ser dados de alta a domicilio desde el SUH (81,4%, 71,2% y

67,1%) (p=ns). Ingresaron en planta convencional (6,8%, 20,3% y 27,1%, respectivamente) (p<0,013). Sólo 2 (1,7%) pacientes del grupo 1 y 3 (2%) del grupo 2, ingresaron en la unidad de cuidados intensivos y en Psiquiatría 1 (0,8%) del grupo 1. Se fugaron del SUH 6 (5,1%) pacientes del grupo 1, y ninguno de los otros grupos (p=0,003). Fueron éxitus, 1 (0,8%) del grupo 1, 3 (2,0%) del grupo 2 y 3 (4,3%) del grupo 3 (p= ns).

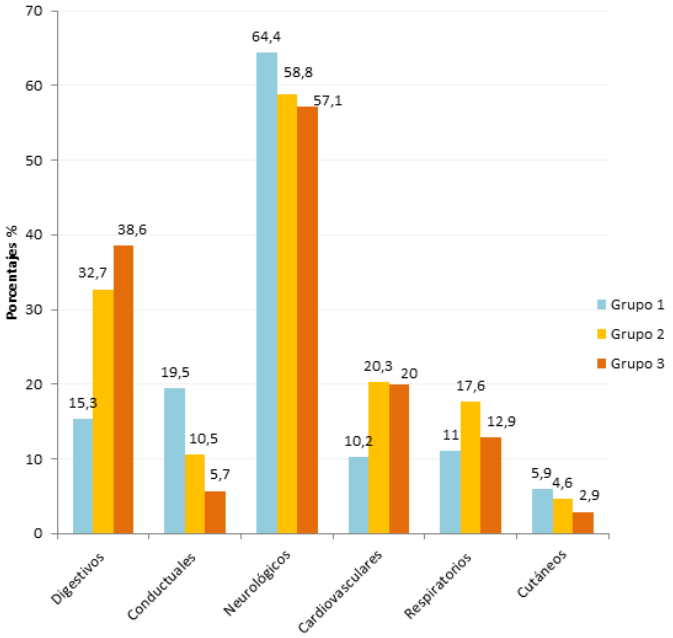


Figura 1: Sintomatología de la intoxicación.

Tabla 3. *Tratamiento e intervenciones en la intoxicación durante su estancia en urgencias.*

	Grupo 1 66-75 años n (%)	Grupo 2 76-85 años n (%)	Grupo 3 >85 años n (%)	p
Tratamiento:	**76 (64,4)**	**114 (74,5)**	**60 (80,7)**	**0,020**
Inespecífico	58 (49,2)	85 (55,6)	44 (62,9)	ns
Antídoto	**9 (7,6)**	**22 (14,4)**	**15 (21,4)**	**0,025**
A. Gástrica	1 (0,8)	2 (1,3)	1 (1,4)	ns
Carbón Activado	5 (4,2)	4 (2,6)	2 (2,9)	ns
Sol. Alcalina	2 (1,7)	1 (0,7)	0	ns
SVB	19 (16,1)	25 (16,3)	17 (24,3)	ns
SVA	1 (0,8)	3 (2,0)	1 (1,4)	ns
Contención mecánica	**7 (5,9)**	**1 (0,7)**	**0**	**0,006**
VMNI	2 (1,7)	1 (0,7)	0	ns
Diálisis	1 (0,8)	0	0	ns
Cámara hiperbárica	0	1 (0,8)	0	ns
Det. Tóxicos en orina	48 (40,7)	81 (52,9)	37 (52,9)	ns
IC a Psiquiatría	**31 (26,3)**	**19 (12,5)**	**7 (10,0)**	**0,007**
Comunicado judicial	13 (11,0)	18 (11,9)	4 (5,7)	ns

A.Gástrica: Aspiración Gástrica; SVB: Soporte vital básico; SVA: Soporte vital avanzado; VMNI: Ventilación mecánica no invasiva; DetTóxicos en orina.: Determinación de tóxicos en orina; IC: Interconsulta.

Discusión

Existen pocos estudios sobre IA en pacientes de edad avanzada según el grupo etario. En nuestro estudio se encontraron diferencias en los tres grupos, principalmente entre los ≤75a y >75a.

Como en otras series, en los grupos de mayor edad predominaron mujeres[7,9,10,11,12,13], y en el grupo joven predominaron hombres[1,14,15]. Y aunque a partir de los 50-55 años ya hay más mujeres que hombres en nuestra población de estudio, según el Instituto de Estadísticas de Cataluña[16], esta diferencia aumenta de manera exponencial a medida que avanza la edad, siendo más evidente a partir de los 75 años. Otras razones que explicarían estas diferencias, podrían ser, la causa de intoxicación, siendo la más frecuente en ≤75a la recreativa y el tóxico más implicado, el alcohol, coincidiendo con otros estudios realizados a nivel nacional[5,14]. Mientras que en los >75a predominó la causa accidental[2,5,9,10,11,15]; y en estos, el tóxico predominante fueron los fármacos[2,5,6,13], probablemente vinculado también a que es en esta franja de edad, en donde existe mayor probabilidad de estar presente la polifarmacia o elevada comorbilidad, fragilidad, posible deterioro cognitivo, etc. [6,13]. Respecto a esto último, quizá se justifica también que a mayor edad, aumentó

el porcentaje de IA producidas en domicilio[13,17].

Comparado con otros estudios[1,4,5], en los cuales han quedado en primer lugar las benzodiacepinas, en nuestro estudio el fármaco más frecuentemente responsable de intoxicación en los grupos 2 y 3 fue la digoxina, en segundo lugar, las benzodiacepinas y en tercero, los opiáceos. Esto pone de manifiesto la persistencia en el uso de digoxina en el paciente mayor en la población estudiada, así como el aumento en la prescripción de opioides[5]. Por ello y considerando el estudio de Karbakhsh et al[15] en el que la intoxicación por opiáceos superó la mitad de los casos, se debería reflexionar sobre la importancia de optimizar estrategias para el uso adecuado de medicamentos en el anciano.

Se observó un elevado porcentaje de intoxicaciones por productos domésticos; esto podría traducir la posibilidad de alteraciones cognitivas (variable no registrada en nuestro estudio) en los grupos de mayor edad, tal y como se muestra en el estudio de Klein-Swartz[4] et al. Esto mismo también podría explicar la alta frecuencia de IA accidentales, en domicilio y por fármacos encontrada en nuestra muestra.

Los síntomas neurológicos sobresalieron en los 3 grupos, probablemente por la participación de benzodiacepinas[18], opiáceos y alcohol. Entre los grupos de mayor edad siguieron por frecuencia, los síntomas digestivos y cardiovasculares, quizá relacionados a intoxicación digitálica si tomamos en consideración lo encontrado en estudios previos[19,20], y a diferencia de lo encontrado en el estudio Yu-Hui Hu et al, en el cual son los neurológicos seguidos de los gastrointestinales y respiratorios. En el grupo joven, en cambio, el segundo más frecuente fue la alteración conductual probablemente relacionada con el alcohol, quizá explicando también la mayor necesidad de contención mecánica que hubo en éstos.

En nuestra muestra, casi el 65% de pacientes precisaron tratamiento, mayoritariamente inespecífico. A mayor edad, mayor uso de antídotos, sobresaliendo flumazenil y naloxona, en concordancia al porcentaje encontrado de intoxicaciones por benzodiacepinas y opiáceos.

Aunque la mayoría de los pacientes fueron dados de alta a domicilio, destaca al igual que en el estudio de Kyunghee et al, que tuvieron mayor necesidad de ingreso hospitalario los grupos 2 y 3, debido quizás y resaltando nuevamente, la alta probabilidad de que en estos pacientes haya una elevada comorbilidad y/o fragilidad[6,13].

De los 7 casos de éxitus, 5 fueron causa accidental por fármacos (3 por digoxina, 1 opioide, 1 hipoglucemiante) y 2 fueron suicidios (1 polifarmacia + alcohol y 1 ác. clorhídrico). De lo anterior, destaca un bajo porcentaje de mortalidad (2,0%) inferior comparado con otra serie[13]. El suicidio consumado (0,5%) coincide con que, a mayor edad, hubo menos antecedentes de intoxicaciones previas y de patología psiquiátrica a diferencia de otros estudios[1,7,13].

Con todo lo anterior, se concluye que las IA en pacientes >65a representan un porcentaje no despreciable del total de intoxicaciones atendidas en un SUH lo que invita a tenerlas siempre presentes como diagnóstico diferencial en el motivo de consulta a urgencias en los pacientes en este rango de edad. Hay diferencias significativas según aumenta la edad destacando como punto de corte los 75 años, y que por encima de esta edad hay mayoría de mujeres, IA de tipo accidental, en domicilio y por causa farmacológica, con especial mención de la digoxina y las benzodiacepinas, sin perder de vista a los opiáceos.

Dentro de las limitaciones del estudio, están el carácter retrospectivo y unicéntrico del mismo, así como la falta de registro de otras variables específicas para la edad.

Bibliografía

1. *Hu YH, Chou HL, Lu WH, Huang HH, Yang ChCh, David H.T. Yen, et al*. Features and Prognostic Factors for Elderly With Acute Poisoning in the Emergency Department. JCMA 2010;73:78-87.
2. *Cassidy N, Lee SK, Donegan CF, Tracey JA*. Poisoning in older adults: the experience of the National Poisons Information Centre. Ir Med J 2008;101(9):268–70.
3. *Burillo-Putze G, Munné P, Dueñas A, Pinillos MA, Naveiro JM, Cobo J, et al.* National Multicentric study of acute intoxication in emergency departments of Spain. Eur J Emerg Med 2003;10(2):101-4.
4. *Klein-Schwartz W, Oderda GM*. Poisoning in the elderly. Epidemiological, Clinical and Management Considerations. DrugsAging 1991;1(1):67-89.
5. *Miranda-Arto P, Ferrer-Dufol A, Ruiz-Ruiz FJ, Menao-Guillén S, Civeira-Murillo E.* Intoxicaciones agudas en pacientes mayores de 65 años. An. Sist. Sanit. Navar 2014;37(1):99-108.
6. *Mühlberg W, Becher K, Heppner HJ, Wicklein S, Sieber C.* Acute poisoning in old and very old patients: a longitudinal retrospective study of 5883 patients in a toxicological intensive care unit. Z GerontolGeriatr 2005;38(3):182-9.
7. *Kim K, Choi JW, Park M, Kim MS, Lee ES.* A nationwide study of patients hospitalised for poisoning in Korea based on Korea National Hospital Discharge In-Depth Injury Survey data from 2005 to 2009. BMJ Open 2015;5: e008823.DOI:10.1136/bmjopen-2015-008823.
8. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World report on ageing and health. World Health Organization. 2015.www.who.int (consultado en Noviembre de 2018)
9. *Kaya E, Yilmaz A, Saritas A, Colakoglu S, Baltaci D, Kandis H, et al*. Acute intoxication cases admitted to the emergency department of a university hospital. World J Emerg Med 2015;6(1):54-9.
10. *Pérez-Guitían P, Nogué-Xarau S, Ríos-Guillermo J, Navas-Tejero I, Alonso-Viladot JR.* Evaluación de las intoxicaciones agudas por productos químicos atendidas en un Servicio de Urgencias. MedClín 2011;136(4):149-52.
11. *Exiara T, Mavrakanas TA, Papazoglou L, Papazoglou D, Christakidis D, Maltezos E.* A prospective study of acute poisonings in a sample of Greek patients. Cent Eur J Public Health 2009;17(3):158-60.
12. *Supervía A, Pallàs O, Clemente C, Aranda MD, Pi-Figueras M, Cirera I.* Características diferenciales de las intoxicaciones en los pacientes ancianos atendidos en un servicio de urgencias. Emergencias 2017;29:335-8.
13. *Doak MW, Nixon AC, Lupton DJ, Waring WS. Self*-poisoning in older adults: patterns of drug ingestionand clinical outcomes. AgeAgeing 2009;38:407-11.
14. *González-Fernández D, Alonso-Fernández M.* Intoxicaciones agudas en un Servicio de Urgencias. Estudio descriptivo en el área Sanitaria III de Asturias. RevToxicol 2009;26:122-7.
15. *Karbakhsh M, Zandi NS*. Pattern of poisoning in the elderly: An experience from Tehran. ClinToxicol (Phila) 2008;46:211-7.
16. Anuario Estadístico de Cataluña. Demografía. Población por sexo y grupos de edad (periodo revisado del 2009 al 2014). Instituto de Estadísticas de Cataluña [www.idescat.cat] (consultado en Abril de 2020)
17. *Kroner BA, Scott RB, Waring ER, Zanga JR*. Poisoning in the elderly: characterization of exposures reported to a poison control center. J Am Geriatr Soc. 1993;41(8):842-6.
18. *Vukcevic NP, Ercegovic GV, Sergt Z, Djordjevic S, Stosic JJ*. Benzodiacepine poisoning in elderly. Vojnosanit Pregl. 2016;73:243-8.
19. *Nogué S, Cino J, Civeira E, Puiguriguer J, Butrillo-Putze G, Dueñas A, et al*. Tratamiento de la intoxicación digitálica. Bases para el uso de los anticuerpos antidigital. Emergencias. 2012;24:462-75.
20. *Supervía A, Salgado E, Calpe X, Galicia M, García Gibert L, Córdoba F, et al*. Mortalidad inmediata y a los 30 días en las intoxicaciones digitálicas atendidas en servicios de urgencia de Cataluña. Emergencias 2019; 31: 39-42

Rev. Toxicol (2020) 37: 48 - 54

Experiencia en el manejo de intoxicaciones por Betabloqueadores y Calcioantagonistas: serie de casos y revisión de la literatura

*Duque JJ[1], Caicedo J[2], Estrada AF[3], Berrouet MC[4], Zuluaga-Gómez M[5]**

[1]Médico Universidad San Martin. Residente Medicina de Urgencias, Universidad CES, Linea de Investigación Medicina de Urgencias y Toxicología CES. Medellín, Colombia.
[2]Especialista en Medicina de Urgencias, Universidad CES. Urgentóloga Hospital Pablo Tobon Uribe, Medellin, Colombia.
[3]Especialista en Medicina de Urgencias, Universidad CES. Urgentólogo Hospital Pablo Tobon Uribe, Medellin, Colombia. Especialista en Gerencia de IPS. Docente de cátedra Facultad de Medicina UPB. Docente Adscrito Universidad CES. Linea de Investigación Medicina de Urgencias y Toxicología CES. Medellín, Colombia.
[4]Especialista en Toxicología Clínica Universidad de Antioquia, Medelín, Colombia. Toxicóloga Hospital General de Medellín, Climica SOMA, Docente de farmacología y Toxicología Universidad CES. Linea de Investigación Medicina de Urgencias y Toxicología CES. Grupo de investigación HGM – CES. Medellín, Colombia.
[5]Médico Universidad Pontificia Bolivariana. Residente Medicina de Urgencias, Universidad CES, Medellin, Colombia. Estudiante de la Especialización en Gerencia de IPS, Universidad CES. Linea de Investigación Medicina de Urgencias y Toxicología CES. Medellín, Colombia.

Resumen: La intoxicación por betabloqueantes y calcio antagonistas suele generar una gran morbilidad y mortalidad secundaria a sus efectos tóxicos cardiovasculares, como son los trastornos de la conducción cardíaca y la caída en la resistencia vascular periférica. En sobredosis, los beta bloqueantes y calcio antagonistas tienen similar presentación clínica y su tratamiento suele ser común entre ellos, en varios puntos del manejo. Estas intoxicaciones, a menudo, son refractarias al manejo médico estándar, por lo que las intervenciones a realizar deben ser ordenadas y estandarizadas con conocimiento profundo de la farmacología. Las emulsiones lipídicas no son el tratamiento de primera línea para las intoxicaciones por calcio antagoistas y betabloqueantes y se usan solamente cuando se han agotado las otras opciones terapeúticas descritas, siendo una alternativa eficaz para el manejo de este tipo de intoxicaciones. En este trabajo se pretende, con una serie de casos y revisión de la literatura, analizar la evidencia disponible en el paso a paso del abordaje y tratamiento de los pacientes intoxicados por calcio antagonistas y betabloqueantes planteando un algoritmo de manejo.

Palabras clave: Bloqueadores de los canales de Calcio; Antagonistas Adrenérgicos beta; Emulsiones grasas intravenosas; Técnica de Clampeo de la Glucosa; Glucagón.

Abstract: ***Experience in the management of intoxications by Beta-blockers and Calcium-antagonists: case series and review.***

The poisoning by beta blockers and calcium antagonists usually generates great morbidity and mortality secondary to its cardiovascular toxic effects such as cardiac conduction disorders and the decrease in peripheral vascular resistance. In overdose beta blockers and calcium antagonists have a similar clinical presentation and their treatment usually overcomes, these poisonings are often refractory to standard medical management so the interventions to be performed must be ordered and standardized with deep knowledge of pharmacology. Lipid emulsions are not the first-line treatment for antagonistic calcium blockers and beta blockers, they are used only when the other therapeutic options described have been exhausted but they are an effective alternative for the management of this type of poisoning. It is intended with this series of cases and review of the literature to analyze the evidence available in the step-by-step approach and treatment of calcium-poisoning patients antagonists and beta blockers posing a management algorithm.

Key words: Calcium Channel Blockers; Adrenergic beta-Antagonists; Far Emulsions, Intravenous; Glucose Clamp Technique; Glucagon.

Introducción

La intoxicación por betabloqueadores y calcio antagonistas puede ser el resultado de una ingesta no intencional, un intento suicida o un error en la dosificación de la medicación, generando gran morbilidad y mortalidad secundaria a sus efectos tóxicos cardiovasculares, principalmente por los trastornos de la conducción cardíaca y la caída en la resistencia vascular periférica (Truit el at, 2012. Mowry et al 2015. Love et al, 2000). Según el reporte anual de los Centros para el Control y la prevención de Enfermedades (CDC) del 2014- 2015, en Estados Unidos aproximadamente 2.277 personas al año son tratadas en los servicios de urgencias como consecuencia de una intoxicación, de éstas el 47,6% corresponden a medicamentos de formulación habitual donde resaltan los calcio antagonistas y beta bloqueantes (Mowry et al 2015).

En Colombia se puede observar cómo las intoxicaciones han aumentado en los últimos años. El Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) para el período entre 2017-2018 reporta una incidencia de 55.6 casos por cada 100.000 habitantes y para el mes de Agosto del 2019 se reportan 2967 casos de toxicidad por medicamentos, con una letalidad de 3,4 por cada 100.000 (Instituto Nacional de Salud, 2019). Estrada et al, (2018) encontró en un período de 4 años en tres instituciones participantes de la ciudad de Medellín (Colombia), que el 19,3% de los casos por intoxicación se debió a medicamentos de uso común incluyendo betabloqueadores y calcio antagonistas, con un 74% de intención suicida (Estrada et al, 2018).

Los betabloqueantes ejercen sus efectos farmacológicos a través de receptores beta, aunque existen algunos con efecto alfa. En el miocito, el receptor beta se encuentra acoplado a proteínas G y cuando el receptor es estimulado por el fármaco, aumentan los niveles de Adenosin Monofosfato Cíclico (AMP) y la actividad de la proteinquinasa A, lo que inicia una serie de procesos de fosforilación que finalmente llevan al aumento del nivel del calcio intracelular de la siguiente forma: se activan los canales de calcio tipo L en la membrana celular, permitiendo la entrada de calcio a la célula, además se libera calcio al citoplasma desde las reservas que se encuentran en el retículo sarcoplásmico (Shepherd, 2008; Heath, 1984). Los iones de calcio se unen a la troponina C en el complejo de la troponina desplazando a la tropomiosina y permitiendo la unión de los filamentos de actina con miosina, lo que permite el acortamiento de las fibras musculares para que se de la contracción muscular. Por lo tanto, se debe entender que al ejercer su efecto farmacológico el betabloqueante produce un efecto inotrópico negativo al inhibir todo este mecanismo fisiológico (Shepherd, 2008; Heath, 1984; Bangash et al, 2015).

Los calcio antagonistas ejercen sus efectos a través de la interacción directa y antagonismo de los canales de calcio tipo L, tanto en el miocito cardíaco (los subtipos no dihidropiridínicos) como en el músculo liso vascular periférico (los subtipos dihidropiridínicos) permitiendo la entrada del calcio a la célula, y por estos mecanismos estos medicamentos producirían efectos inotrópicos negativos y vasodilatación (Shepherd, 2008; Kerns, 2007).

Es importante, por lo tanto, comprender el mecanismo de acción de los beta bloqueantes y calcio antagonistas, ya que la vía final común de ambos será el calcio, el cual es absolutamente necesario en la contractilidad del miocito. Es por esto que en la intoxicación con dichas sustancias generará disminución del cronotropismo, dromotropismo e inotropismo cardíaco que se manifestará

*e-mail: mateozg92@hotmail.com

como depresión en la contractilidad cardíaca, bradicardia, bloqueos de la conducción aurículo-ventricular en distinto grado y vasodilatación periférica, por lo que estos pacientes pueden llegar a los servicios de urgencias en choque hemodinámico de difícil manejo (Shepherd, 2008; Heath, 1984; Kerns, 2007).

En sobredosis, los beta bloqueantes y calcio antagonistas tienen similar presentación clínica y su tratamiento suele ser común entre ellos, en varios puntos críticos del manejo. Estas intoxicaciones a menudo son refractarias al manejo médico estándar, por lo que las intervenciones a realizar deben ser ordenadas y estandarizadas con conocimiento profundo de la farmacología (Olson et al, 2009).

Se describen interacciones farmacológicas de importancia clínica de los calcio antagonistas con distintos medicamentos como Digoxina (aumentando entre un 40 a un 90% las concentraciones de la misma), Alfa bloqueantes (potenciando el efecto hipotensor en caso de intoxicación con alguno de esta familia) y betabloqueadores (propiciando las concentraciones de este último además de aumentar el riesgo de trastornos en la conducción y generar disfunción sistólica con choque cardiogénico). Otros medicamentos, como Fenitoina o Rifampicina al ser inductores enzimáticos podran reducir la biodisponibilidad del calcioantagonista (Bendersky et al, 1997; Taddei et al, 2001).

El efecto de bloqueo generado, tanto por los calcio antagonistas como los beta bloqueadores, genera además bloqueo en celulas beta a nivel pancreático, previniendo la liberación de insulina. Ello genera hipoinsulinemia y resistencia a la insulina, causando hiperglicemia o en algunos pacientes crisis hiperglucémica cetósica. En este estado de estrés cadiovascular, los miocitos pasarán de utilizar como sustrato ácidos grasos libres a glucosa (Silverthorn et al, 2010; Kumar et al, 2018).

Así mismo, a nivel sistémico podrá conllevar a hipoperfusión cerebral, resultado de la hipotensión severa, generando alteración del nivel de conciencia, convulsiones o encefalopatía. Habrá ademas, tendencia a la acidosis láctica como resultado del metabolismo anaerobio y la pobre perfusión tisular, por disminución en la conversión del lactato a piruvato en la mitocontria debido a la disminución de entrada del calcio a la célula (Kumar et al, 2018). Se describe además lesión renal aguda por estado de hipotensión e hipoperfusión, siendo de origen prerrenal y llevando incluso a isquemia renal. El edema pulmonar no cardiogénico será resultado de la vasodilatación pulmonar y extravasación alveolar del fluido, por lo que la reanimación hídrica excesiva puede empeorar el cuadro clínico (Stephen et al, 2019. Siddiqi et al, 2014).

La presente revisión y reporte de serie de casos clínicos pretende revisar y estudiar la evidencia disponible en el paso a paso del abordaje y tratamiento de los pacientes intoxicados por calcio antagonistas y beta bloqueantes en un intento de unificar los conceptos en el manejo de las mismas.

Resultados

Caso clínico 1

Paciente femenina de 17 años, soltera, sin hijos, estudió bachillerato incompleto, ama de casa. Inicialmente consulta a una institución de mediana complejidad con historia de intoxicación medicamentosa por múltiples sustancias, pero por su condición clínica es llevada en traslado no regulado a otra institución de alta complejidad por diagnóstico de choque cardiogénico con bradicardia e hipotensión refractaria al manejo inicial con líquidos y dopamina Intravenosa (IV). La paciente ingresa al hospital de alta complejidad después de 4 horas de ingesta de las sustancias, en malas condiciones generales, inestable hemodinámicamente, pálida, fría, diaforética, con alteración sensorial, hipotensa, con presión arterial de 78/30 mmHg, bradicárdica, con frecuencia cardíaca de 56 latidos por minuto y el resto de signos vitales dentro de parametros de normalidad. Los familiares aportan varios blíster vacíos de losartán, amlodipino, verapamilo, metoprolol, nitrofurantoina, prazosina, y fluoxetina que son presuntamente los medicamentos implicados en el cuadro actual. Se desconoce la cantidad de cada uno de los medicamentos ingeridos. Se concluye que se trata de una intoxicación por múltiples antihipertensivos con efectos adversos cardiovasculares, entre los cuales predominan los asociados a la intoxicación por calcio antagonistas y beta bloqueantes.

Se inicia manejo con vasopresor tipo noradrenalina y gluconato de calcio IV, requiriendo aumento progresivo del vasopresor hasta dosis altas (1,5 mcg/kg/min) por lo que se adiciona glucagón IV en bolos hasta llegar a una dosis máxima de 10 mg IV y debido a la persistencia del choque se inicia manejo con hiperinsulinemia euglicémica y finalmente es necesario administrar emulsión lipídica. La paciente logra un regular control de su hemodinamia y es trasladada a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) para vigilancia clínica.

Los datos clínicos de ingreso muestran electrocardiograma con bradicardia sinusal, frecuencia cardíaca de 53, con onda p presente en bloqueo auriculoventricular de primer grado, manifestación de RSr en derivadas del electrocardiograma V1 y V2, Gases arteriales pH 7.29, pCO2 35mmHg, pO2 180mmHg, Glucosa 222mg/dL, Lactato 1.2mmol/L, HCO3 18 mmol/L BE -9.0, Química sanguínea Alanino Aminotransferasa (ALT) 41 UI/L, Aspartato Aminotransferasa (AST) 38 UI/L, Creatinina 1.04mg/dL, BUN 19mg/dL, Sodio (Na) 136 mmol/L, Cloro (Cl) 111 mmol/L, Potasio (K) 4.32 mmol/L, Calcio (Ca) 8 mg/dL, Magnesio (Mg) 1.7 mg/dL, Hemoglobina (Hb) 12.7 g/dL, Hematocrito (Hto) 37%,Leucocitos 35300 células/uL, Neutrofilos 78%, Linfocitos 12%, Bandas 6%, Plaquetas 288000 células/mm^3.

En la UCI inician monitoreo hemodinámico invasivo, bicarbonato en infusión y se logra estabilización hemodinámica con desmonte gradual de soporte vasopresor y alta directa desde la UCI a su hogar después de 72 horas de vigilancia clínica sin ningún tipo de secuela. Los diagnósticos finales de esta paciente fueron: Intento suicida, intoxicación polimedicamentosa grave (principalmente calcio antagonistas y beta bloqueantes), choque refractario resuelto.

Caso clínico 2

Paciente femenina de 18 años, consulta al servicio de urgencias de un hospital de alto nivel de complejidad después de ingerir de 60 tabletas de amlodipino de 10mg en un intento autoinflingido de características impulsivas. Ingresó al servicio con una presión arterial de 110/70mmHg y una frecuencia cardíaca de 150 latidos por minuto. Se inició manejo con líquidos endovenosos (solución salina a 100 cc/hora) y gluconato de calcio al 10% una ampolla cada 8 horas y posteriormente observación clínica. Los datos paraclínicios iniciales fueron: Hemoglobina 13,3g/dL, Hematocrito 38.5%, Leucocitos 22.200 células/uL, 80% Neutrofilos, Plaquetas 328.000 células /uL, Magnesio 1.82 mg/dL, Cloro 110mmol/L, Potasio 3.38 mmol/L, Sodio 135 mmol/L, Calcio 9.6mg/dL, BUN 13.4mg/dL, Creatinina 1.36 mg/dL, pH 7.53, PCO2 18.7mmHg, pO2 88.5mmHg, HCO3 15.5 mmol/L, BE -7.2. Posteriormente, presentó caída de la presión arterial, por lo cual se inició infusión de Noradrenalina a 0,5mcg/kg/minuto titulado. Requirió vigilancia en la UCI con soporte vasopresor y ventilatorio (requiere asegurar vía aérea) y posteriormente necesitó inicio de vasopresina a dosis de 2.4U/h. A las 24 horas requirió aumento en el soporte ventilatorio, por falta de mejoría clínica se ordenó bolo de gluconato de calcio 60mL y posteriormente infusion a 1.2ml/kg/hora, por persistencia de signos de hipoperfusión se inició solución hiperinsulinemia euglicémica a 1UI/Kg/hora, para este momento presentó deterioro de función renal (creatinina 2.7mg/dL) e hiperlactatemia de 5.26mmol/L, por lo que se decidió inicio de azul de metileno 2mg/kg con dos dosis subsecuentes. Se solicitaron niveles de metahemoglobina, los cuales fueron menores al 5%, requiriendo hemofiltración e infusión de bicarbonato. Se inició soporte por ECMO pero a las 48 horas la paciente fallece.

Caso clínico 3

Paciente de masculino 16 años que acude al servicio de urgencias de un

hospital de alto nivel de complejidad 12 horas después de la ingesta voluntaria de 24 tabletas de Acetaminofén, 30 tabletas de Propanolol y 10 tabletas de Doxiciclina. Al ingreso se encuenta con presión arterial de 120/70mmHg, frecuencia cardíaca de 85 latidos por minuto, frecuencia respiratoria de 18 por minuto. Se inició infusión de N Acetil Cisteína 50mg/kg para 4 horas y después 100mg/kg durante 16 horas, e inmediatamente se inicia Gluconato de Calcio en bolo 30ml. Los datos clínicos del ingreso fueron Hemoglobina 10.8/dL, Hematocrito 32.5%, Leucocitos 19200 células/u, 84% Neutrófilos, 13% linfocitos, 3% bandas, Plaquetas 190.000 células /uL, Sodio 142 mmol/L Potasio 3.91 mmol/L, Magnesio 2.12 mg/dL, Cloro 108mmol/L, Calcio 8.2 mg/dL, BUN 15 mg/dL, Creatinina 0.98 mg/dL, pH 7.18, PCO2 32.3 mmHg, pO2 94.3 mmHg, HCO3 13.2 mmol/L, BE -8.4. A las 24 horas de vigilancia, se documenta bradicardia extrema (frecuencia cardíaca de 36 latidos por minuto) con Bloqueo Auriculoventricular de primer grado, por lo cual se inicia Dopamina a dosis de 5mcg/kg/min con adecuada respuesta. A las 48 horas después se logra desmontar Dopamina e infusión de Calcio y se logra dar de alta sin secuelas ni otras complicaciones.

Discusión

Existe poca evidencia respecto al manejo de estas intoxicaciones, pero es necesario conocer los estudios disponibles para optimizar el abordaje y el manejo temprano y específico de estos pacientes.

Las metas de reanimación inicial en el paciente intoxicado no difieren de las de otras patologías críticas, donde se deben priorizar y diagnosticar los eventos potencialmente fatales por medio de la valoración del A-B-C-D-E (vía aérea, ventilación, circulación, déficit neurológico) con el fin de lograr la estabilización inicial del paciente (Olson et al, 2009).

Es muy común que los pacientes intoxicados ingresen a los servicios de urgencias por ingesta de múltiples tipos de medicamentos, los cuales van a ejercer sus efectos tóxicos por medio de varias vías farmacológicas. Ante tal escenario, priman en primer lugar las medidas de estabilización universal y posteriormente tratar de identificar las sustancias específicas ingeridas, con el fin de definir cuales son los riesgos específicos de éstas (cardiovascular, neurológico, renal, etc) e instaurar el tratamiento dirigido a cada una (Mowry et al, 2015. Olson et al, 2009; Arroyave et al, 2008).

A continuación se describen las medidas específicas en el tema de la intoxicación con betabloqueantes y calcio antagonistas.

1. Liquidos endovenosos y vasopresores:

La reanimación hídrica es la primera medida común ante el escenario de hipotensión sostenida que proponen diferentes protocolos, sin embargon la evidencia cada vez aporta más hacia reanimaciones restrictivas definidas como un bolo inicial de 10 cc/kg de cristaloides e infusiones posteriores, de acuerdo a la tendencia hemodinámica del paciente, con el fin de evitar efectos adversos asociados a la sobrehidratación, como lo son el edema pulmonar cardiogénico y no cardiogénico (Shepherd, 2008).

En este contexto, ya que el choque no es de tipo hipovolémico sino cardiogénico y vasopléjico (como se observa en el segundo caso donde hubo un amplio uso de cristaloides), se recomienda la instauración temprana de vasoactivos como la dopamina y la noradrenalina, prefiriendo esta última cuando no hay bradicardia extrema (en casos de bradicardia extrema podría ayudar más el efecto agonista beta uno de la dopamina (Holger et al, 2006). Se requerirá titular la dosis con el fin de obtener una presión arterial media mínima de 65 mmHg y en muchas ocasiones se necesitarán altas dosis e incluso el uso combinado de vasopresores para lograr las metas de presión arterial, como se evidencia en el segundo y en el tercer caso descrito (Arroyave et al, 2008. Holger et al, 2006. Graudins et al 2015).

2. Calcio:

El calcio es parte del manejo inicial de esta intoxicación, recordando que dicho ión es la vía común farmacológica de ambas sustancias, y en teoría, el aumento del calcio extracelular ejerce un efecto antagonista competitivo y la sobreposición de este en los canales de calcio aumenta teóricamente la entrada del ión a la célula (Ramoska et al, 1993). Estos resultados están descritos en modelos biológicos experimentales y voluntarios sanos. La cinética en escenario de intoxicaciones agudas no es conocida.

El calcio puede ser usado como una medida temporal mientras se prepara la instauración de otros agentes inotrópicos, no se debe usar como única medida farmacológica ya que es poco probable que su administración aislada pueda proveer un adecuado soporte hemodinámico en los pacientes con intoxicación severa. Un esquema recomendado es iniciar con dosis de cloruro de calcio de 10 ml IV o gluconato de calcio 30 ml IV (este último es el que tenemos disponible en Colombia) hasta un máximo de 3 dosis y seguir una infusión de 0.6 – 1.6 ml/kg/h tolerando un aumento del calcio ionizado hasta 2 veces el valor superior del limite de referencia (Ramoska et al, 1993; Angulo et al, 2012).

3. Glucagón:

El glucagon es otra estrategia que ha sido aceptada de forma histórica como parte de la terapia estándar en el manejo temprano de los pacientes con estas intoxicaciones pero especialmente se ha avalado su uso para los beta bloqueantes. Al glucagón se le atribuyen acciones cronotrópicas e inotrópicas positivas cuyos efectos se traducen en incremento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial media y reversión transitoria de los bloqueos auriculo-ventriculares por medio del incremento de las concentraciones de AMPc, el cual a su vez aumenta el calcio intracelular por los mecanismos que se habían explicado previamente. Este incremento lo hace de manera directa a través de un "bypass" al receptor, por lo que es independiente de la modulación habitual de las catecolaminas por los receptores alfa y beta (Boyd, 2013; Bailey, 2003).

Se recomienda dar dosis de glucagon de 3 a 5 mg IVy en caso de no tener mejoria hemodinámica repetir con 4 a 10 mg IV administrados en 10 minutos (Shepherd, 2008).

El glucagón no debe ser considerado como terapia de primera línea o terapia única en ninguno de estos escenarios, sino que debe formar parte de un grupo escalonado de intervenciones en la reanimación de los pacientes. El uso de glucagón se recomienda tras el inicio de vasopresores a dosis óptima, después del uso de calcio y medidas de reanimación estándar. Actualmente, la evidencia que existe en humanos se limita a reportes de casos y series de casos, la mayoría de la evidencia se ha extrapolado de estudios animales pero ésto no quiere decir que no tenga efectos positivos en el manejo de estos pacientes y por lo tanto es factible recomendar su uso en esta intoxicación (Shepherd, 2008; Bailey, 2003).

4. Hiperinsulinemia euglicémica:

La hiperinsulinemia euglicémica ha emergido a través de los años como un recurso a usar en la intoxicación por calcio antagonistas y beta bloqueantes. En los pacientes con estas intoxicaciones se ha observado que hay interrupción del metabolismo de los ácidos grasos, una disminución de la producción de insulina en los islotes beta pancreáticos y una resistencia relativa a la insulina en el miocardio, por lo que esta terapia aumenta la disponibilidad de insulina permitiendo el transporte intracelular de glucosa y el aprovechamiento de ésta por parte del miocardiocito. A estos mecanismos se les atribuye el efecto inotrópico positivo que de esta solución (Truitt, 2012).

Si bien no hay buena evidencia respecto a su uso, varios reportes de caso (Lherureux et al, 2006; Engebretsen et al, 2017; Sandroni et al, 2004) muestran un efecto benéfico en estos pacientes especialmente en aquellos con choque cardiogénico. Esta terapia inicia su acción a los 5 minutos, con tasas de respuesta máximas entre los 15 y 45 minutos; se administra a dosis de 1 unidad/kg de insulina cristalina en 0.5 g/kg de dextrosa (al 5 o 10%) en bolo y se continua con la mitad de la dosis por

cada hora hasta que haya mejoria de los parametros hemodinámicos con vigilancia continua de las glucometrías y los niveles de potasio por riesgo de hipokalemia (Shepherd, 2008; Lheureux, 2006. Sandroni et al, 2004).

5. Emulsiones lipidícas:

Las emulsiones lipídicas son compuestos formados por triglicéridos y fosfolípidos que se utilizan como parte de la nutrición parenteral y sirven también como vehículo para algunos medicamentos (como por ejemplo el Propofol), como manejo en algunas intoxicaciones como por los anestésicos locales y sustancias liposolubles como los betabloqueantes, los calcioantagonistas y los antidepresivos tricíclicos, entre otros. En nuestro medio la emulsión lipídica que se encuentra con mayor frecuencia disponible es el Intralipid® (Litonius, 2012; Fresenius, 2017).

Las emulsiones lipídicas no pueden ser por ahora consideradas el tratamiento de primera línea para las intoxicaciones por calcio antagoistas y betabloqueantes. La evidencia de su uso proviene de series de reportes de caso y de revisiones narrativas donde se ha atribuido una relación causal a su efectividad con las tasas efectivas de retorno a la circulación espontánea, lo que ha parecido prometedor en el tiempo. No obstante, debe ser claro que el pilar de tratamiento fundamental sigue siendo instaurar de forma temprana medidas de reanimación básica y avanzada dirigidas a soporte cardiovascular temprano,

evitando condicionar el proceso de reanimación a un elemento cuya disposición esta condicionada en el medio y es recurso solo de hospitales de alta complejidad fuera del servicio de urgencias. Por tanto, se considera que las emulsiones lipídicas se pueden considerar solamente cuando se han agotado las otras opciones terapeúticas descritas.

Existen varias teorias respecto al uso y la acción de las emulsiones lipídicas:

- El tóxico o la sustancia liposoluble es atrapada en el centro lipídico de la emulsión, mecanismo conocido como "lipid sink" o inmersión lipídica y así se evitra que el tóxico o sustancia no se una al sitio de acción en los diferentes órganos, reduciendo su volúmen de distribución y efectos tóxicos (Rothschild, 2010).
- Los cardiomiocitos tienen predilección por la utilización de ácidos grasos para la producción de ATP (80-90% de la fuente de ATP proviene de la fosforilación oxidativa de ácidos grasos) y las emulsiones lipídicas facilitan la recuperación de la carnitin acilcarnitín translocasa, la cual es necesaria en este metabolismo de ácidos grasos permitiendo que se optimice el metabolismo y la producción energética en la célula miocárdica (Levine et al, 2016).
- Los lípidos permiten la modulación de los potenciales de acción de los canales de sodio y calcio de la membrana celular, activándolos en su presencia y ejerciendo un efecto cardioprotector (Hoegberg, 2017).
- Las emulsiones lipídicas producen un estímulo a los receptores adrenérgicos con efectos directos sobre las ATPasa miocárdicas reduciendo los niveles endoteliales de óxido nítrico por medio de inhibición de la óxido nítrico sintasa y así su efecto vasodilatador (Levine et al, 2016).

Las emulsiones lipídicas están disponibles en varias concentraciones, siendo las presentaciones más frecuentes al 10, 20 y 30%. La mayoría de reportes de caso y estudios han utilizado la concentración al 20%. Dentro de las dosificaciones utilizadas la que más coincide en la literatura es iniciar con un bolo de 1,5ml/kg de una solución de lípidos al 20% y posteriormente continuar una infusión de 0,25ml/kg/min de la misma solución (American College of Medical Toxicology, 2011).

6. Azul de metileno:

El azul de metileno se ha usado para el manejo del choque refractario con evidencia extrapolada del manejo del choque post cirugía cardíaca, septicemia y anafilaxia que comparten como factor común la depleción de reservas metabólicas miocárdicas, la vasoplejia y redistribución de flujo. Sin embargo, existe cada vez más valor agregado en el escenario de choque inducido por intoxicaciones, ya que esta sustancia actúa inhibiendo la oxido nítrico sintasa y la guanosina monofosfato cíclica cuya modulación se traduce en menor impacto secundario a la toxicidad por estas sustancias y mejor respuesta a los vasopresores; la dosis recomendada de azul de metileno es 1-2 mg/kg como una única dosis (Jang et al, 2011).

7. Otras intervenciones

a. Marcapasos

El marcapasos transcutáneo es la estrategia óptima de manejo en los pacientes con bradiarritmias inestables, bloqueos AV de segundo grado avanzado y tercer grado. Los marcapasos han sido utilizados en estas intoxicaciones en pacientes con bradicardia sintomática e inestabilidad hemodinámica. La evidencia en torno a su uso es escasa en escenario de intoxicación aguda por beta bloqueadores y calcio antagonistas, limitada a reportes de casos y series que describen en algunos pacientes problemas tanto en la conducción como en la captura. Sin embargo, la mejoría hemodinámica fue considerablemente superior cuando se lograron buenos índices de captura ventricular con el marcapasos; por lo tanto, puede ser considerado como una de las terapias a realizar con otras medidas de intervención (Lee et al, 1995. Mcglinchey, 1998).

b. Inotrópicos:

La dobutamina es un inotrópico que mediante la estimulación de receptores B1 adrenérgicos y alfa 1 adrenérgicos aumenta el inotropismo, cronotropismo y con efecto vasodilatador periférico agregado. Está descrito en la literatura que el efecto per se de la intoxicación lleva a un efecto no predecible de este inotrópico por el contexto de bloqueo de receptores beta; además, dado que uno de los espectros críticos de la intoxicación es el síndrome vasopléjico, el perfil farmacodinámico de este fármaco no es el óptimo en el manejo de las intoxicaciones por beta bloqueadores o calcio antagonismos, por lo que debe evitarse.

El levosimendán y el milrinone también se han usado en estos pacientes, pero sin evidencia aún que avale su uso (Levine et al, 2013. Hollenberg, 2011).

c. Dispositivos de asistencia extracorpórea (ECMO- Balón de contrapulsación)

Se han utilizado en pacientes que no responden a ninguna de las terapias previamente mencionadas. Dado el carácter reversible de estas intoxicaciones, estos dispositivos pueden permitir ganar tiempo para permitir la redistribución, metabolismo y eliminación hasta que la función cardíaca se recupere (Baud et al, 2007. Daubin et al, 2009).

d. Atropina

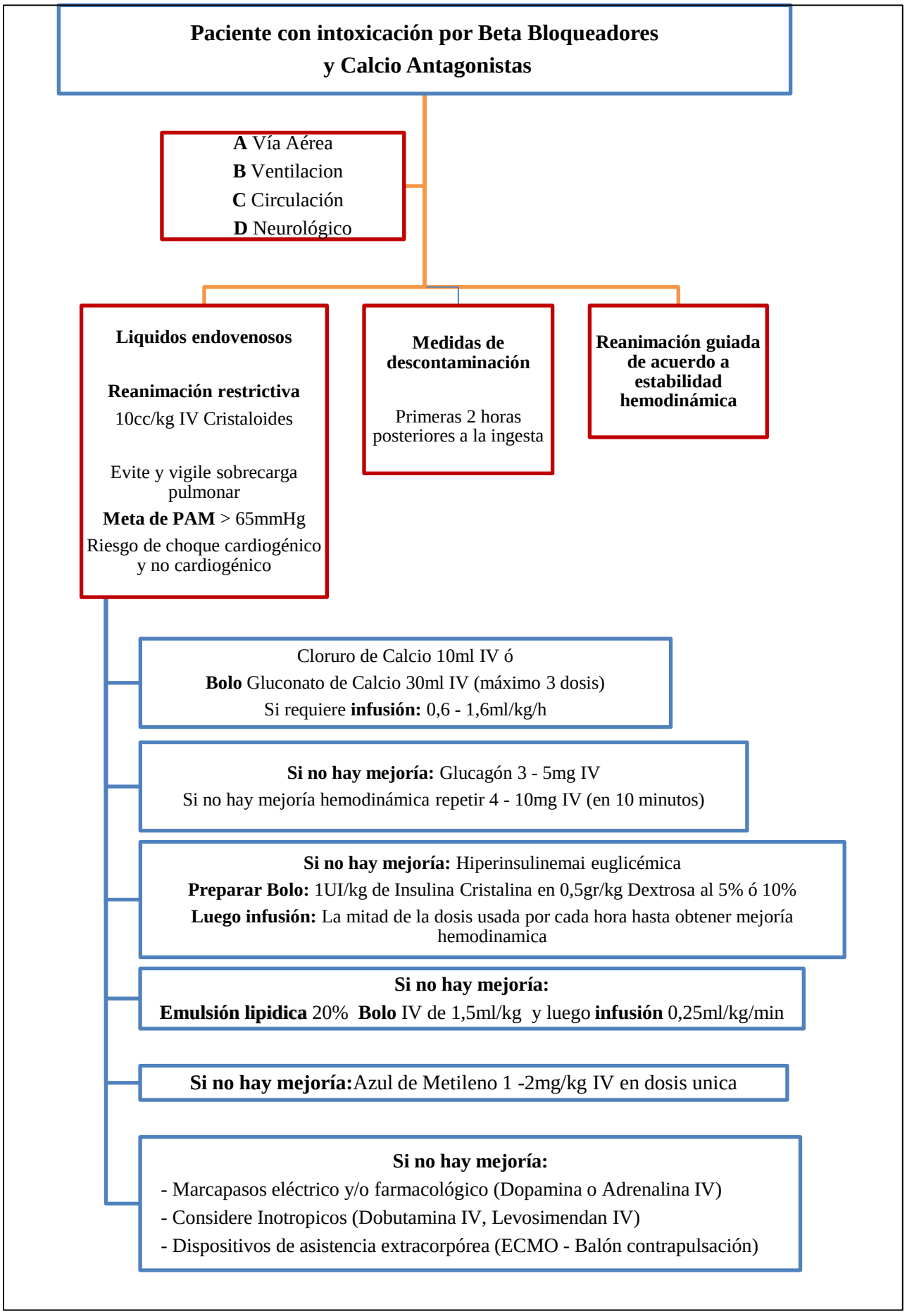
La terapia con atropina habitualmente sugerida en el contexto de bradicardia sintomática suele ser ineficaz y no tiene ningún papel en el manejo de estos pacientes. Hollenberg (2011) observa una elevación transitoria de la frecuencia cardiaca pero rápidamente hay recurrencia de la bradicardia y las dosis repetidas tampoco muestran efectos positivos, por el contrario, incurren en riesgo de presentación de síndrome colinérgico (Hollenberg, 2011).

En este contexto, se propone un algoritmo de manejo para la intoxicación por beta bloqueadores y calcio antagonistas (Tabla 1).

Conclusiones

El tratamiento de las intoxicaciones severas por calcioantagonistas y betabloqueantes es, en definitiva, un gran reto que requiere a menudo un enfoque multidisciplinario y multimodal. La toxicidad es debida a depresión miocárdica, bradicardia, reducción de la contractilidad y

Tabla 1. *Algoritmo de manejo de pacientes con intoxicación por Beta Bloqueadores y Calcio Antagonistas.*



efectos adversos por medio de varios manejos de forma escalonada de acuerdo a la respuesta del paciente.

Es destacable reconocer que los beneficios a la terapia variarán acorde a las condiciones farmacocinéticas y farmacodinamicas dependientes del fármaco, el uso de otros medicamentos o sustancias, la variabilidad interindividual de cada paciente y el correcto abordaje.

A través de esta revisión de tema y reporte de experiencia de manejo de tres casos, se logra proponer un manejo integral farmacológico y no farmacológico de intoxicaciones severas con beta bloqueadores y calcio antagonistas, para tener en cuenta dentro de la práctica clínica.

Bibliografía

1. American College of Medical Toxicology. ACMT position statement: interim guidance for the use of lipid resuscitation therapy. J Med Toxicol. 2011;7(1):81-2.
2. *Angulo DM, Grille P, Albornoz H, Álvez JI, Bagnulo H, Tratamiento C De, et al.* Intoxicación grave por bloqueadores de los canales de calcio. Rev Méd Urug 2012;28(3):225.
3. *Arroyave C, Gallego H, Tellez J, Rodriguez J et al.* Guías para el Manejo de Urgencias Toxicológicas. Minist Protección Soc. 2008;25-347.
4. *Bailey B.* Glucagon in beta-blocker and calcium channel blocker overdoses: a systematic review. J Toxicol Clin Toxicol. 2003;41(5):595-602.
5. *Bangash MN, Kong ML, Pearse RM*. Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients. Br J Pharmacol. 2012 Apr;165(7):2015-33.
6. *Baud FJ, Megarbane B, Deye N, Leprince P*. Clinical review: aggressive management and extracorporeal support for drug-induced cardiotoxicity. Crit Care. 2007;11(2):207.
7. *Bendersky M, Kuschnir E.* Controversias con antagonistas cálcicos. Rev Fed Cardiol 1997; 26 (3): 309 – 321.
8. *Boyd RR.* Glucagon for the treatment of symptomatic β blocker overdose Buscopan (hyoscine butylbromide) in abdominal colic. Emergency Medicine Journal 20(3):266-7.
9. *Daubin C, Lehoux P, Ivascau C, Tasle M, Bousta M, Lepage O, et al.* Extracorporeal life support in severe drug intoxication: a retrospective cohort study of seventeen cases. Crit Care. 2009;13(4):R138.
10. *Engebretsen KM, Kaczmarek KM, Morgan J, Holger JS.* High-dose insulin therapy in beta-blocker and calcium channel-blocker poisoning. Clin Toxicol (Phila). 2011;49(4):277-83.
11. *Estrada AF, Berrouet MC, Zuluaga M, Ortiz A, Franco AK, Misas LE, et al.* Epidemiología de las intoxicaciones agudas en los servicios de urgencias hospitalatrias. Medellín, Colombia. Rev Toxicol 2018; 35: 119-123.
12. Fresenius Kabi. Lipid emulsion. 2017[Internet]. [citado 22 de septiembre de 2017]. Disponible en: http://www.fresenius-kabi.es/pdf/nutri_info/Nutri_Info_02.pdf
13. *Graudins A, Lee HM, Druda D.* Calcium channel antagonist and beta-blocker overdose: antidotes and adjunct therapies. Br J Clin Pharmacol. 2016;81(3):453-61.
14. *Heath A.* Beta-adrenoceptor blocker toxicity: clinical features and therapy. Am J Emerg Med. 1984; 2(6):518-25.
15. *Holger JS, Engebretsen KM, Obetz CL, Kleven TL, Harris CR.* A comparison of vasopressin and glucagon in beta-blocker induced toxicity. Clin Toxicol (Phila). 2006;44(1):45-51.
16. Instituto Nacional de Salud. Boletin Epidemiológico Semanal: Semana epidemiológica 34 de 2019. Internet]. [citado 14 de Octubre de 2019]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiológico%20semana%2034.pdf
17. *Kerns W.* Management of beta-adrenergic blocker and calcium channel antagonist toxicity. Emerg Med Clin North Am. 2007 May;25(2):309-31
18. *Kumar K, Biyyam M, Bajantri B, Nayudu S. Critical* management of severe hypotension caused by amlodipine toxicity managed with hyperinsulinemia/euglycemia therapy supplemented with calcium gluconate, intravenous glucagon and other vasopressor support: Review of literature. Cardiol Res 2018;9(1):46-49.
19. *Lheureux PE, Zahir S, Gris M, Derrey AS, Penaloza A.* Bench-to-bedside review: hyperinsulinaemia/euglycaemia therapy in the management of overdose of calcium-channel blockers. Crit Care. 2006;10(3):212.
20. Litonius, Erick. Treatment of acute intoxication with intravenous lipid emulsion: animal and human studies treatment. Department of Anaesthesia and Intensive Care Department of Clinical Pharmacology Helsinki University Central Hospital University of Helsinki. Helsinki, 2012. Finland. [Internet]. [citado 22 de septiembre de 2017]. Disponible en: https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/35261/treatmen.pdf?se
21. *Hoegberg LCG, Gosselin S.* Lipid resuscitation in acute poisoning: after a decade of publications, what have we really learned? Curr Opin Anaesthesiol. 2017;30(4):474-479.
22. *Hollenberg SM*. Vasoactive drugs in circulatory shock. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(7):847-55.
23. *Jang DH, Nelson LS, Hoffman RS.* Methylene blue in the treatment of refractory shock from an amlodipine overdose. Ann Emerg Med. 2011 Dec;58(6):565-7.
24. *Lee DW, Cohan B.* Refractory cardiogenic shock and complete heart block after verapamil SR and metoprolol treatment. A case report. Angiology. 1995;46(6):517-9.
25. *Levine M, Curry SC, Padilla-Jones A, Ruha AM.* Critical care management of verapamil and diltiazem overdose with a focus on vasopressors: a 25-year experience at a single center. Ann Emerg Med. 2013;62(3):252-8.
26. *Levine M, Hoffman RS, Lavergne V, Stork CM, Graudins A, Chuang R, et al;* Lipid Emulsion Workgroup. Systematic review of the effect of intravenous lipid emulsion therapy for non-local anesthetics toxicity. Clin Toxicol. 2016;54(3):194-221.
27. *Love JN, Howell JM, Litovitz TL, Klein-Schwartz W.* Acute beta blocker overdose: factors associated with the development of cardiovascular morbidity. J Toxicol Clin Toxicol. 2000;38(3):275-81
28. *McGlinchey PG, McNeill AJ.* Drug overdoses requiring temporary cardiac pacing; a study of six cases treated at Altnagelvin Hospital, Londonderry. Ulster Med J. 1998;67(1):13-8
29. *Mowry JB, Spyker DA, Brooks DE, McMillan N, Schauben JL.* 2014 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 32nd Annual Report. Clin Toxicol (Phila). 2015;53(10):962-1147.
30. *Olson KR, Erdman AR, Woolf AD, Scharman EJ, Christianson G, Caravati EM, et al*; American Association of Poison Control Centers. Calcium channel blocker ingestion: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. Clin Toxicol(Phila). 2005;43(7):797-822

31. Ramoska EA, Spiller HA, Winter M, Borys D. A one-year evaluation of calcium channel blocker overdoses: toxicity and treatment. Ann Emerg Med. 1993;22(2):196-200.

32. Rothschild L, Bern S, Oswald S, Weinberg G. Intravenous lipid emulsion in clinical toxicology. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2010 Oct 5;18:51.

33. Sandroni C, Cavallaro F, Addario C, Ferro G, Gallizzi F, Antonelli M. Successful treatment with enoximone for severe poisoning with atenolol and verapamil: a case report. Acta Anaesthesiol Scand. 2004 Jul;48(6):790-2.

34. Shepherd G. Treatment of poisoning caused by beta-adrenergic and calcium-channel blockers. Am J Health Syst Pharm. 2006;63(19):1828-35.

35. Siddiqi TA, Hill J, Huckleberry Y, Parthasarathy S. Non-cardiogenic pulmonary edema and life-threatening shock due to calcium channel blocker overdose: A case report and clinical review. Respir Care 2014;59(2):e15-e21

36. Silverthorn D. Cardiovascular physiology. In: Espinoza D, German K, Yien B, Reid A, Cutt S, Earl W, eds. Human Physiology: An Integrated Approach. 5th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2010:467-511.

37. Stephen V, Pluymers NA, Gauton SJ. Emergency management of calcium channel blocker overdose. S Afr Med J 2019; 109 (9): 635 - 638

38. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L y col. Effect of calcium antagonists or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilataion and oxidative stress in essential hypertensive patients. J Hypertens 2001;19 (8): 1370 – 1386.

39. Truitt CA, Brooks DE, Dommer P, LoVecchio F. Outcomes of unintentional beta-blocker or calcium channel blocker overdoses: a retrospective review of poison center data. J Med Toxicol. 2012;8(2):135-9.

Revisión de los modelos computacionales que relacionan la estructura química con la disrupción del sistema endocrino

Goya-Jorge, E. [1,2]*, de Julián-Ortiz, J.V.* [3]*, Gozalbes, R.* [1*]

[1] ProtoQSAR SL., CEEI (Centro Europeo de Empresas Innovadoras), Parque Tecnológico de Valencia. Av. Benjamin Franklin 12, 46980 Paterna, Valencia, España.
[2] Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España.
[3] Unidad de Diseño de Fármacos y Topología Molecular, Departamento de Química-Física. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España.

Resumen: El término interruptor endocrino define una amplia y diversa clase de sustancias de origen natural o antropogénico con la capacidad de interferir con alguna función del sistema endocrino y provocar efectos adversos en un organismo o su descendencia. La disrupción endocrina se asocia con cáncer, obesidad, diabetes, disfunción reproductiva e inmunológica. Constituye una forma específica de toxicidad cuyas regulaciones y legislación actualmente carecen de consenso. Los métodos computacionales, y particularmente los estudios quimioinformáticos como las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), son herramientas valiosas de investigación que han ocupado gradualmente un importante espacio en los estudios toxicológicos. Esta revisión propone un análisis del más reciente estado del arte relativo a la modelación QSAR de la disrupción endocrina. Los casos de estudio seleccionados se centran en tres mecanismos importantes que representan la biosíntesis, el transporte y la interacción con los receptores hormonales mediados por la capacidad inhibitoria de la enzima aromatasa, y los efectos sobre la proteína transportadora de transtiretina y el receptor de andrógenos, respectivamente. Estas herramientas predictivas pueden ayudar a priorizar sustancias como posibles alteradores endocrinos y, por lo tanto, son contribuciones importantes que garantizan el ahorro de tiempo, materiales y recursos humanos.

Palabras clave: QSAR, modelos computacionales, interruptor endocrino, TTR, aromatasa, hormona.

Abstract: ***Protection against Endocrine Disruption through Quantitative Structure-Activity Relationship modelling***

The endocrine disruptors are defined as a broad and diverse class of substances of natural or anthropogenic origin with the ability to interfere with some function of the endocrine system and, in doing so, cause adverse effects on an organism or its descendants. Endocrine disruption, associated with pathologies such as cancer, obesity, diabetes, and reproductive and immunological dysfunction, constitutes a specific form of toxicity whose regulation and legislation currently lack consensus. Computational methods, and within them chemoinformatic studies such as the prediction of quantitative structure-activity relationships (QSAR), are valuable research tools that have gradually occupied an important space in toxicological studies. This review proposes an analysis of the most recent state of the art related to QSAR modelling in the context of endocrine disruption. For this, case studies reported on three important hormonal mechanisms were selected, which represent synthesis, transport, and interaction with receptors. The summarized QSARs modelled the inhibitory capacity of the aromatase enzyme and the effects on the transthyretin transporter protein and the androgen receptor. These predictive tools can assist in prioritizing substances as potential endocrine disruptors and are therefore important contributions that guarantee the saving of time, material, and human resources.

Keywords: QSAR, endocrine disruptor, TTR, aromatase, androgen receptor, hormone.

Introducción

Desde mediados del siglo XX, la capacidad de ciertos compuestos químicos de irrumpir en el organismo y causar modificaciones en las funciones de las hormonas ha preocupado a la comunidad científica internacional (Gassner et al., 1958). Por su terminología en inglés "*endocrine disruptors*" o "*endocrine disrupting chemicals*", se ha extendido y popularizado su nombre indistintamente como "disruptores endocrinos" (anglicismo), interruptor o alterador endocrino. En mamíferos, aves, reptiles y peces, los efectos de estas sustancias se han detectado en alteraciones del comportamiento sexual, la masculinización de hembras y la feminización de machos, que incluye la reducción del tamaño de los órganos sexuales, así como la pérdida de su funcionalidad. Otras consecuencias son el desarrollo de malformaciones y procesos cancerosos, niveles séricos anómalos de las principales hormonas, problemas de fertilidad, perturbaciones en la respuesta inmune, disminución de la capacidad de aprendizaje y de la memoria a corto y largo plazo. Niveles elevados de compuestos interruptores endocrinos en fluidos como la leche materna han revelado el riesgo de exposición temprana a estos tóxicos (Schug et al., 2016; Yilmaz et al., 2020).

La publicación del libro de Rachel Carson *"Silent Spring*" en 1962 supuso para el público en general una llamada de atención ante las consecuencias a largo plazo de la contaminación medioambiental, y en particular sobre los riesgos potenciales en la reproducción de productos químicos sintéticos como el dicloro difenil tricloroetano (DDT). Sin embargo, la primera tentativa global de establecer una definición formal de los compuestos que provocan efectos adversos al interactuar con el sistema endocrino data de 1991 (Bern et al., 1991).

A nivel europeo, la primera iniciativa en relación con los alteradores endocrinos fue la aprobación en el Parlamento, en octubre de 1998 de la "Resolución sobre las sustancias químicas que provocan perturbaciones endocrinas" propuesta por la Comisión de Medio Ambiente, Salud Pública y Protección del Consumidor. Comenzó a raíz de esta resolución a aplicarse en la Unión Europea la aún vigente "Estrategia Comunitaria para los Alteradores Endocrinos" con diferentes proyectos de investigación asociados (Karjalainen et al., 2017).

En una de las primeras resoluciones adoptadas por el Parlamento Europeo en el año 2000, se enfatizó la necesidad de desarrollar sistemas de control de riesgo rápidos y efectivos, y de actuar inmediatamente en la identificación de sustancias con potencial toxicidad endocrina. El Parlamento y el Consejo de Ministros se harían eco de este imperativo al proyectar la disrupción endocrina como parte del Reglamento (CE) N.º 1907/2006 (REACH, acrónimo de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas), así como la creación de la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA, del inglés "*European Chemicals Agency*"). De conformidad con REACH, los alteradores endocrinos se identifican como sustancias extremadamente preocupantes, junto con las consideradas carcinógenas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción (sustancias CMR), con objetivo de reducir su uso y sustituirlas progresivamente por otras alternativas más seguras.

Junto a la creciente llamada de atención en torno a la disrupción endocrina en la década de los 90, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) publicaron numerosas directivas en pro de reducir la experimentación animal en la investigación científica. Se intensificaría así el ya notable interés en la aplicación de métodos alternativos al uso de animales, y entre ellos los estudios

*e-mail: rgozalbes@protosar.com

computacionales o modelación "QSAR" (del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationships*).

Actualmente, el desarrollo de métodos QSAR continúa siendo una temática de creciente impacto en el campo toxicológico y farmacológico (Gozalbes et al., 2015; Lin et al., 2020). La aplicación de esta metodología para la predicción de la toxicidad endocrina causada por compuestos químicos a través de la enzima aromatasa, la proteína transportadora transtiretina y el receptor de andrógenos será objeto de revisión en este artículo.

El estudio que se presenta fue desarrollado en el contexto del proyecto europeo H2020- PROTECTED: "*Protection against endocrine disruptors; detection, mixtures and health effects, risk assessment and communication*" (http://protected.eu.com/) que tiene como objetivo integrar diversos métodos de evaluación de la toxicidad endocrina de compuestos y mezclas químicas, así como promover la conciencia social de los riesgos que supone la disrupción endocrina.

Panorama conceptual y teórico

2.1. El sistema endocrino y su disrupción

2.1.1. Las hormonas

Las hormonas son mensajeros químicos que se encargan de regular y coordinar las funciones metabólicas principales, el crecimiento y el desarrollo de diferentes poblaciones de células en un organismo. No existe ningún órgano o sistema en el cuerpo humano fuera del control de una o varias rutas del sistema hormonal, más conocido como sistema endocrino (Tata, 2017). De acuerdo con su estructura química, las hormonas se clasifican en tres grupos: péptidos/proteínas, esteroides y aminas. Algunas de las principales hormonas humanas y las glándulas endocrinas donde son secretadas se muestran en la Figura 1.

La complejidad del sistema endocrino queda evidenciada en la diversidad estructural y funcional de las moléculas hormonales representada en la Figura 1 (Leblebicioglu et al., 2013). Existen hormonas de naturaleza puramente hidrofóbica como es el caso de las esteroidales que derivan del lípido colesterol y entre las cuales se encuentran las asociadas con la reproducción como el estradiol, la progesterona y la testosterona. Sin embargo, hormonas peptídicas/proteicas como la insulina secretada en el páncreas o la calcitonina en las glándulas tiroideas, están formadas por múltiples cadenas de aminoácidos que le atribuyen propiedades hidrofílicas. Las hormonas de tipo aminas contienen representantes hidrofílicos como la serotonina o la dopamina y otros lipofílicos como la tiroxina (Soto et al., 2009).

2.1.2. La actividad hormonal

La secreción o síntesis de hormonas es un proceso que implica múltiples tejidos debido a las variadas funciones que tienen estas moléculas en el organismo. En el caso de las hormonas esteroideas, los mecanismos enzimáticos involucrados se agrupan como: enzimas específicas del citocromo P450 (CYPs), hidroxiesteroide-deshidrogenasas (HSDs) y esteroide reductasas (Miller WL, 1988). Un ejemplo característico es la enzima P450 aromatasa (CYP19A1), la única capaz de catalizar en vertebrados la reacción de aromatización que transforma andrógenos en estrógenos (Sanderson, J.T., 2006). Otra enzima importante es la hemoproteína transmembrana glicosilada tiroperoxidasa (TPO), que desempeña un papel crucial en la síntesis de hormonas tiroideas (Yen, 2001).

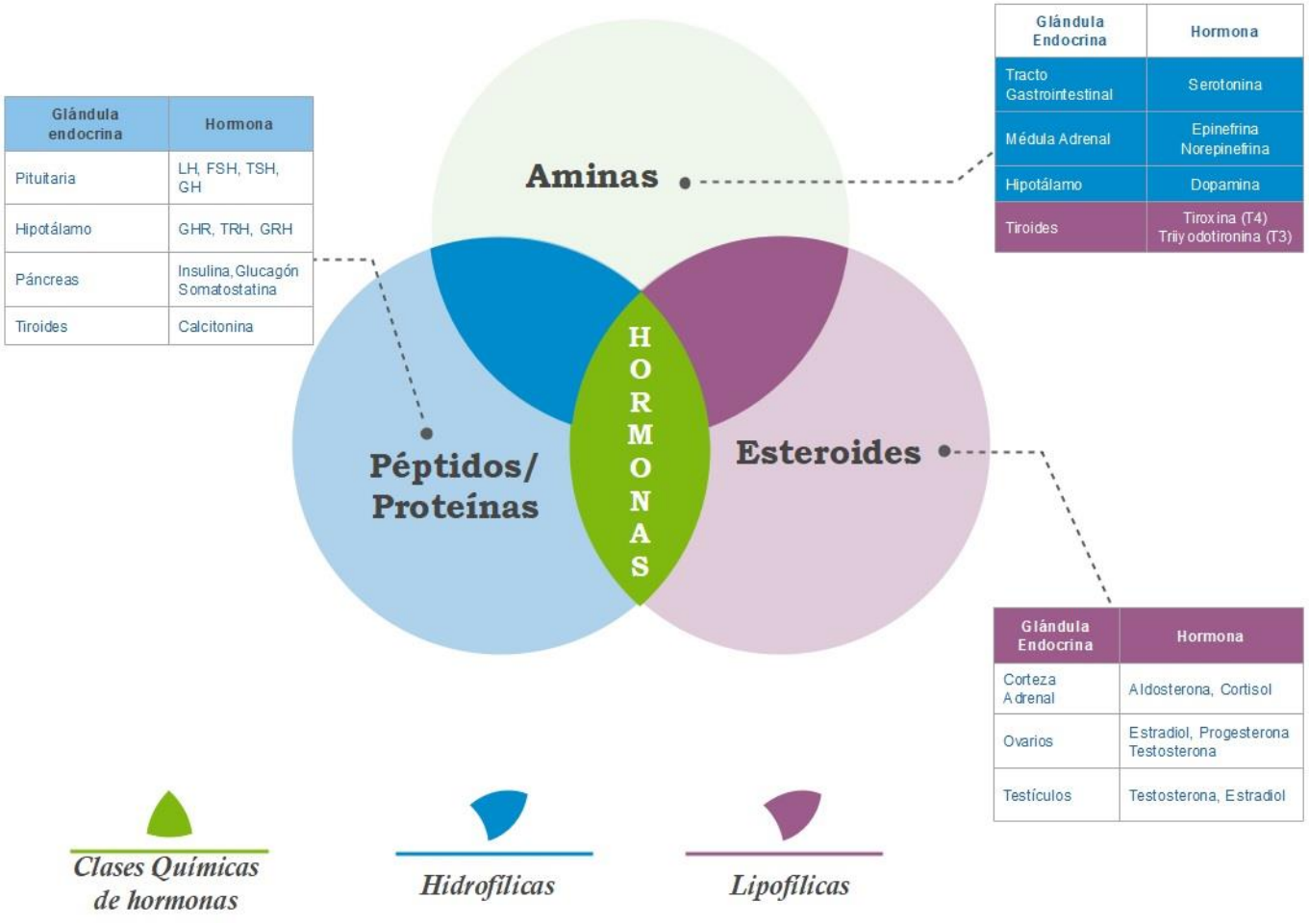


Figura 1: Diagrama de las clases químicas de hormonas y algunos ejemplos de las glándulas endocrinas que las secretan.

El proceso de señalización endocrina involucra a un gran número de receptores y rutas celulares. Un grupo importante es la superfamilia de receptores nucleares (NR), reguladores de la transcripción y activados por ligandos endógenos y exógenos. Estos receptores suelen compartir patrones de organización estructural que incluyen un dominio N-terminal variable, uno central de unión al ADN y uno C-terminal al cual se unen ligandos como las hormonas, pero también prostaglandinas, ciertas vitaminas y ácidos grasos (McEwan, 2016). Están relacionados con diversas funciones fisiológicas en los metazoos que van desde el crecimiento, desarrollo y reproducción hasta el metabolismo y la homeostasia. Algunos de los receptores nucleares más conocidos son el receptor de estrógenos (ESR), el receptor de andrógenos (AR), y los receptores de hormonas tiroideas (TR). Son estos receptores también la diana de múltiples xenobióticos que, mimetizando o antagonizando el efecto de las hormonas, interrumpen la homeostasia endocrina causando diversas consecuencias tóxicas (Balaguer et al., 2019). El ESR tiene como ligando endógeno la hormona 17β-estradiol (E2). Existen dos subtipos (ESRα y ESRβ), ambos con un papel importante en la fisiología humana. Sin embargo, sus efectos pueden llegar a ser antagónicos en muchos casos. Con el descubrimiento de ESRβ se reveló que las funciones estrogénicas no se limitaban a la reproducción femenina, sino que tenían relación con muchos otros órganos y sistemas en ambos sexos (McEwan, 2016; Tata, 2017). Por otro lado, la activación del AR está ligada a las hormonas androgénicas testosterona y 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT). Fisiológicamente el AR es el responsable de la diferenciación sexual masculina, desde el útero, hasta los cambios que acontecen en la pubertad. En el hombre adulto sus efectos han sido relacionados con la masa y la fuerza muscular (Leblebicioglu et al., 2013). Por último, los receptores tiroideos se pueden encontrar expresados a partir de dos genes independientes (α y β), y cada gen tiene a su vez 2 isoformas del receptor. Intervienen entre otras funciones en el crecimiento, el desarrollo y la regulación del metabolismo (Little, 2016).

2.1.3. La disrupción endocrina

La acción sobre receptores nucleares, como se ha mencionado anteriormente, está entre los mecanismos más comunes por los cuales sustancias de todo tipo pueden alterar el efecto de las hormonas (Balaguer et al., 2019). Sin embargo, muchas otras rutas de interrupción del sistema endocrino han sido identificadas a consecuencia de la acción de entidades químicas (WHO/UNEP, 2013). Los más importantes se representan en la Figura 2.

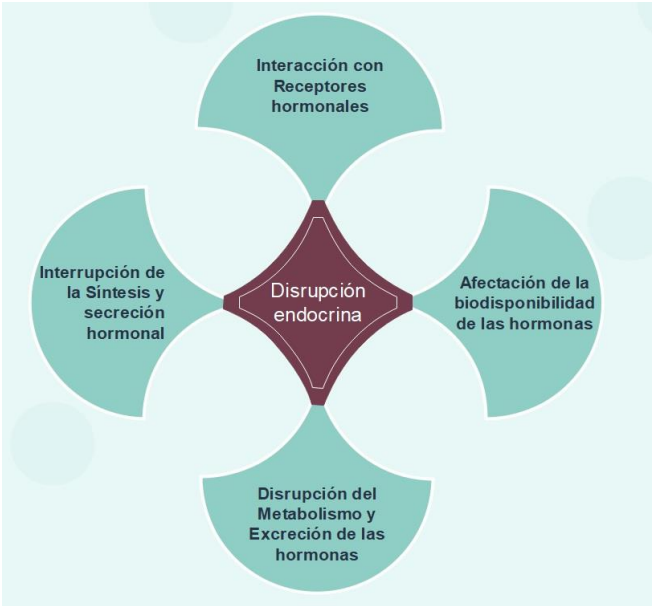


Figura 2: Principales mecanismos de disrupción del sistema endocrino causado por agentes químicos.

La toxicidad sobre el sistema endocrino puede ser causada por la alteración de la síntesis y secreción de hormonas, afectando por ejemplo la aromatasa P450 o inhibiendo la TPO. Diferentes compuestos químicos son capaces de causar también modificaciones en la biodisponibilidad y en la unión a proteínas trasportadoras como las globulinas de enlace a hormonas sexuales (SHBG), las de corticosteroides (CBG) y la transtiretina (TTR) (Cheek et al., 1999; Hong et al., 2015). Además, han sido descritos otros mecanismos de disrupción del metabolismo y la excreción de hormonas.

Por otro lado, los elementos que regulan la activación o desactivación no fisiológica de rutas hormonales dependen, entre otros factores, de la capacidad de respuesta de las distintas células y tejidos, lo que a su vez está condicionado por la afinidad hacia el receptor, el número de receptores disponibles, la concentración hormonal y la presencia de cofactores que puedan favorecer o reprimir sus efectos. Los perfiles de expresión de los receptores suelen variar también durante el desarrollo, y una hormona es capaz de cumplir diferentes roles en un momento u otro del crecimiento. Los múltiples elementos involucrados complican por tanto el estudio de las acciones celulares de las hormonas, así como el perfil toxicológico de los compuestos que interfieren con los mecanismos endocrinos (Vandenberg et al., 2013).

Durante décadas de estudio e investigación, diversos compuestos han demostrado tener capacidad para alterar el sistema endocrino ocasionando numerosas consecuencias fisiológicas. Sin embargo, no existe una definición universalmente aceptada por las entidades científicas y regulatorias para los llamados "interruptores endocrinos". La principal limitación consiste en la dificultad de integrar en un único concepto la diversidad estructural, los mecanismos de acción y los escenarios de exposición asociados con la toxicidad endocrina (Schug et al., 2016).

Así por ejemplo, la Comisión Europea asume la definición establecida por la OMS en el informe emitido por el Programa Internacional de Seguridad Química de 2002 según la cual un interruptor endocrino es *"*una sustancia o mezcla exógena que altera la(s) función(es) del sistema endocrino, causando consecuentemente efectos adversos para la salud en un organismo, su progenie o (sub)poblaciones*"* (WHO, 2002). Sin embargo, la *Endocrine Society* de los Estados Unidos, acordó en 2012 definir los alteradores endocrinos como aquellos "compuestos químicos exógenos o mezclas que pueden interferir con cualquier aspecto de la acción hormonal" (Thomas Zoeller et al., 2012). La inclusión pues, de los efectos adversos a la hora de considerar un compuesto como interruptor endocrino ha abierto una brecha entre ambos conceptos, lo que se traduce en significativas diferencias en el número de sustancias a considerar según una u otra definición.

La falta de coherencia en este sentido no ha impedido que los términos como disrupción, interruptores o alteración endocrina se empleen alegando indistintamente cualquiera de los conceptos. Los interruptores endocrinos se han asumido globalmente como compuestos cuya determinación permite establecer parámetros o criterios de toxicidad relativos a las alteraciones que, por múltiples mecanismos, pueden desencadenar diversos agentes químicos sobre las rutas hormonales. Se obvia, por tanto, en muchos casos la definición establecida por la OMS, y se reportan ensayos, mediciones, determinaciones o modelos de disrupción endocrina en los cuales no se demuestra que el efecto sobre el organismo, su progenie o (sub)poblaciones sea adverso, sino que pueda ser considerado, simplemente, un efecto potencial. Existe, claro está, una necesidad de aunar esfuerzos para sistematizar la definición de los compuestos que deberían considerarse interruptores endocrinos, de manera que su estudio pueda ser abordado en distintos contextos sin generar contradicción.

2.2. Generalidades de la modelación QSAR

La información toxicológica es cada vez más específica y amplia debido a los esfuerzos internacionales de proveer datos científicos para regular las sustancias químicas y garantizar la salud de las personas y del medioambiente. Sin embargo, persisten limitaciones y lagunas de

información. En el caso de la toxicidad endocrina, aun cuando algunos mecanismos han sido dilucidados, existen otros en los cuales el volumen de información es escaso o que las mediciones experimentales son objeto de controversia (Delgado et al., 2012).

Los métodos alternativos a la experimentación animal son particularmente importantes en el campo toxicológico donde han ganado una marcada aceptación. Dentro de las múltiples ventajas que ofrecen destacan el ahorro de tiempo y recursos. Además, la capacidad predictiva de los modelos *in vitro* e *in silico* se ha ido perfeccionando durante décadas, llegando a sustituir hoy día a la experimentación animal en la industria cosmética europea y en gran parte de los estudios de toxicidad ocular y cutánea de sustancias (de Ávila et al., 2019; Tourneix et al., 2020).

2.2.1. Conceptualización

En el caso de los métodos computacionales, destacan los estudios basados en la relación existente entre la estructura química de los compuestos y la actividad/propiedad objeto de interés. Difundidos como QSAR/QSPR (de sus siglas en inglés: *Quantitative Structure-Activity Relationships/Quantitative Structure-Property Relationships*), esta metodología de modelación quimioinformática fue introducida hace más de medio siglo en la práctica farmacéutica y toxicológica, con utilidad además en la agroquímica y la química medioambiental. Su aplicabilidad se refleja en los múltiples trabajos científicos publicados que, como se representa en la Figura 3, superan los ochocientos anuales en la última década.

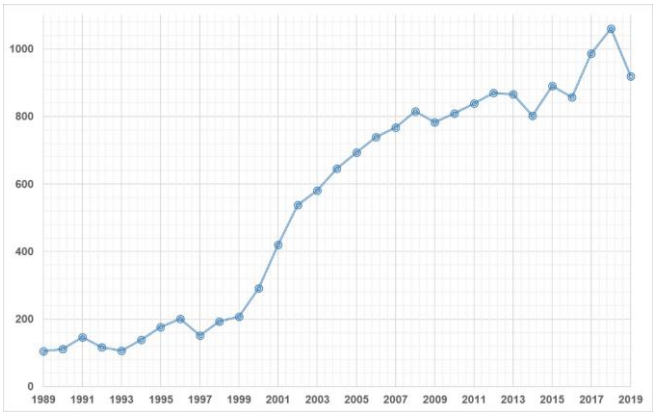


Figura 3: Línea temporal que representa el conteo de publicaciones científicas asociadas con el término MeSH: quantitative structure-activity relationship en la base de datos PubMed

Los modelos QSAR asumen que las características y propiedades de las moléculas, tanto estéricas, geométricas como electrónicas, determinan finalmente su comportamiento en diversos ambientes biológicos, así como las propiedades fisicoquímicas atribuibles a las mismas. Es de esta forma que los tres elementos fundamentales de un estudio QSAR/QSPR son: el concepto de estructura molecular, la definición de descriptores moleculares y la determinación estadística de la relación existente entre la una y la otra.

El concepto de estructura molecular fue un importante aporte de la ciencia de finales del siglo XIX, mientras que la Teoría de Crum-Brown sería el primer sistema de representación gráfica de compuestos químicos, preludio de los que hoy se conocen como descriptores moleculares. Crum-Brown and Fraser introducirían en esa época la llamada "primera formulación de las relaciones cuantitativas estructura-actividad" en la que propusieron que la actividad biológica (Φ) es una función que depende de la constitución química (C), de modo que $\Phi = f(C)$. Por tanto, variaciones en una (ΔC) se reflejan en la otra ($\Delta\Phi$) (Brown and Fraser, 1868).

Transformar la estructura molecular en parámetros que matemáticamente pudieran ser relacionados con las mediciones experimentales de efectos o con las propiedades fisicoquímicas de los compuestos se convirtió por tanto en elemento crucial. Esta parametrización cuantitativa o descripción de las moléculas no es más que "el resultado final de un procedimiento matemático y lógico que trasforma la información química codificada en la representación simbólica, en un número útil o el resultado de algún experimento estandarizado" (Todeschini and Consonni, 2009).

Derivados del análisis de un gran número de teorías, se han definido miles de descriptores moleculares. El contenido de información en sus definiciones ha avanzado también junto al surgimiento de nuevas herramientas estadísticas para el análisis de datos. En general es posible identificar dos clases de descriptores, los basados en medidas experimentales (ej. polarizabilidad, log P, refractividad molar), y los derivados de la representación simbólica de las moléculas, también conocidos como descriptores teóricos. A su vez, los descriptores teóricos se clasifican en descriptores de 0-5D dependiendo de la información estructural que contienen. En los descriptores 0D no se considera la estructura molecular, únicamente la fórmula química de los compuestos (ej. peso atómico, número de átomos). Los descriptores 1D son listas de fragmentos estructurales de las moléculas, pero sin considerar la estructura molecular en su conjunto (ej. conteo de grupos funcionales o de sustituyentes de interés). Los descriptores 2D (o topológicos), ponderan los átomos con propiedades como la electronegatividad o el volumen y consideran la conectividad, así como las interacciones intra/intermoleculares. Los descriptores 3D (o geométricos) permiten la consideración de elementos estereoquímicas de los átomos, mientras que los 4D incluyen además información de campos de interacción como es el caso de las relaciones con los sitios activos de los receptores. Por último, la descripción 5D estima también elementos estereodinámicos en la parametrización de la estructura química de las moléculas (Sahoo et al., 2016).

2.2.2. Sistemática en la modelación QSAR

El desarrollo de modelos QSAR se encuentra en crecimiento y actualización continuos (Cherkasov et al., 2014). Sin embargo, siete pasos comunes rigen su sistemática (Figura 4).

El primer paso en un estudio QSAR, como se muestra en la secuencia de la Figura 4, es la formulación del problema. Es importante desde el comienzo del estudio determinar el objeto de análisis y el nivel de información requerido. Además, se agrupará el mayor volumen posible de información relevante para la construcción de bases de datos amplias o específicas de acuerdo con el interés del trabajo. Seguidamente, se procederá a la parametrización cuantitativa de las estructuras químicas contenidas en la base de datos, empleando para ello la clase de descriptores moleculares que se estime oportuna. La selección de variables permite escoger aquéllas estadísticamente relevantes a través de técnicas como la de pasos sucesivos (SW). Es posible también emplear técnicas de agrupamiento como el análisis de componentes principales (PCA) para generar nuevos descriptores que contengan mayor volumen de información.

La medición de la propiedad de interés suele requerir estrategias de "pretratamiento" de los datos, necesario para garantizar la homogeneidad de la variable respuesta a modelar, dado fundamentalmente el hecho de que a menudo el origen de dichos datos es muy diverso (diferentes fuentes de información, técnicas de medición experimental, etc.). La selección del tipo de modelo QSAR es un paso crucial, y dependerá tanto de la variable respuesta como del conjunto de datos en su totalidad. Según la propiedad o actividad analizada, se identifican globalmente dos tipos de modelos, los de regresión, cuando la variable respuesta es cuantitativa, y los de clasificación, cuando se modelan categorías o clases (Dudek et al., 2006). En ambos tipos de QSARs, la dependencia estadística con los datos estructurales puede o no ser lineal.

Los métodos estadísticos lineales más comunes para relacionar la estructura con la actividad de los compuestos químicos son el análisis discriminante lineal (LDA) para los datos categóricos y la regresión lineal múltiple (MLR) para los datos cuantitativos. También es muy

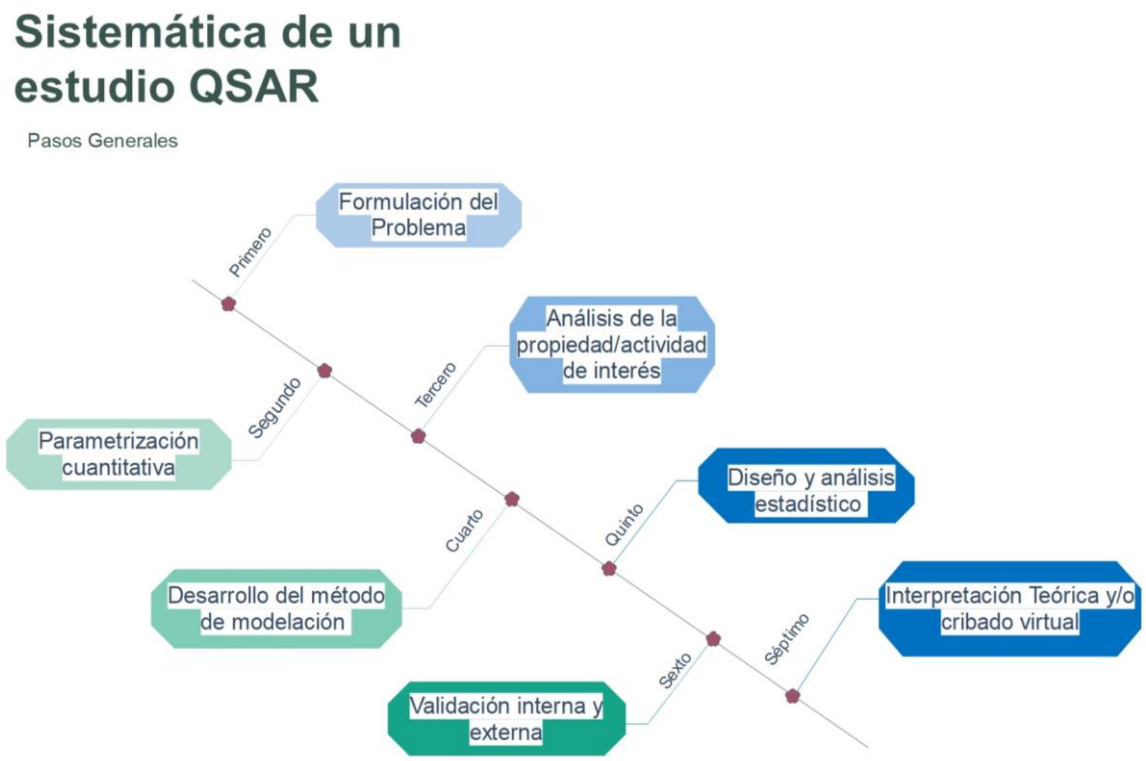


Figura 4: Representación de los siete pasos generales de la modelación QSAR.

empleado el método de mínimos cuadrados parciales (PLS) basado en la factorización de las variables independientes (descriptores). En los modelos PLS se proyectan los descriptores y la variable respuesta en un nuevo espacio y, aunque su aplicación más común es en el análisis de regresión, se ha combinado con el análisis de discriminante (PLS-DA) para modelar categorías binarias.

Las funciones genéticas de aproximación (GFA) son métodos también muy empleados en la construcción de modelos QSAR/QSPR. Inspirados en teorías evolutivas y adaptativas, los GFAs son capaces de generar múltiples modelos de forma eficiente analizando grandes volúmenes de datos. Se han combinado también con los modelos PLS (G/PLS) aprovechando las ventajas de uno y otro (Rogers, 1999). De igual forma, otras funciones que permiten la transformación de los datos como es la basada en el método de Kernel se han acoplado con PLS (KPLS) en el desarrollo de modelos QSAR. En el caso de la clasificación, la técnica de reconocimiento de patrones k-vecinos más cercanos (k-NN) ha demostrado una marcada utilidad en la modelación quimioinformática.

Los métodos predictivos no lineales más comunes y que se emplean para modelar todo tipo de variables en el análisis QSAR, son los algoritmos de aprendizaje automático (*"machine learning"*). Dentro de ellos son muy conocidos los árboles de decisión (DT), que en función de la variable de destino serán árboles de clasificación o de regresión. Además, por su elevada capacidad predictiva algoritmos como las máquinas de soporte vectorial (SVM) y las redes neuronales artificiales (ANN) son frecuentemente utilizados tanto para problemas de regresión y como de clasificación.

Vale la pena mencionar además dos tipos de metodologías que, por su amplia aplicabilidad en el descubrimiento de fármacos, se encuentran entre las más renombradas en el campo de modelación QSAR. Éstas son el análisis comparativo de campo molecular (CoMFA) y el análisis comparativo de índices de similitud molecular (CoMSIA). Los métodos CoMFA y CoMSIA son análisis 3D-QSAR con la particularidad del tipo de descriptores moleculares que se emplean para definir las estructuras químicas. CoMFA emplea los campos potenciales de Lennard-Jones y Coulomb para calcular las energías estéricas y electrostáticas de interacción (Cramer et al., 1988), mientras que CoMSIA calcula las energías de interacción entre los átomos introduciendo una función gaussiana. Por lo general, ambos métodos producen un elevado número de parámetros numéricos que caracterizan las moléculas y que suelen ser agrupados y luego modelados junto a la variable respuesta empleando PLS.

Durante la modelación, es común la división del conjunto de datos en series más pequeñas que son empleadas para el entrenamiento y para la evaluación de la capacidad predictiva de los modelos QSAR. El diseño estadístico de estos subconjuntos de entrenamiento y de predicción puede ser aleatorio o empleando técnicas multivariantes de reconocimiento de patrones para garantizar la distribución racional del conjunto de datos. En cualquier caso, resulta imprescindible aplicar procedimientos de validación para garantizar que los modelos son capaces de generar predicciones confiables, como se detalla a continuación. Por último, la modelación QSAR suele concluirse con la interpretación mecanicista y que generalmente está basada en el análisis de los descriptores moleculares empleados. La mayor aplicabilidad de un modelo predictivo basado en QSAR será en el cribado virtual de compuestos químicos que no han sido estudiados anteriormente.

2.2.3. Principios de validación definidos por la OECD

El proceso de validación de un modelo QSAR demanda la obtención de pruebas estadísticas que demuestren que el método desarrollado es lo suficientemente fiable y reproducible en la generación de los resultados previstos. El espacio químico en el cual un modelo QSAR es capaz de generar predicciones fiables se conoce como dominio de aplicación (Cherkasov et al., 2014; Tropsha et al., 2003). Con el objetivo de estandarizar el desarrollo de los modelos QSAR, la OECD agrupa el proceso de validación en una serie de principios regulatorios (OECD, 2014), representados en la Figura 5 a continuación.

El primer principio de la regulación que establece la OECD, se refiere a definir adecuadamente las variables a modelar (propiedades fisicoquímicas, efectos biológicos o medioambientales). De esta forma, se pretende asegurar la transparencia en la determinación de los parámetros a modelar, ya que pueden haberse obtenido a través de

diferentes protocolos experimentales, o bajo distintas condiciones. La falta de homogeneidad en los datos puede acarrear consecuencias en el desarrollo de los modelos y errores en las predicciones, de ahí la importancia que tiene definir el punto de medición. En el segundo principio se establece que los algoritmos empleados no sean ambiguos, tanto aquellos que definen los descriptores moleculares como los que se emplean en la construcción de las series y los propios modelos estadísticos de QSAR. El establecimiento del dominio de aplicabilidad es un elemento fundamental, que como tercer principio supone la declaración de un espacio de confiabilidad en el cual los modelos desarrollados son capaces de generar predicciones acertadas con una alta probabilidad. La validación propiamente dicha es el cuarto principio, referido a que todo modelo QSAR debe presentar una adecuada bondad de ajuste, robustez y predictividad, sustentado por criterios estadísticos que demuestren el desempeño del modelo (validación interna), y su capacidad para predecir (validación externa). Por último, aun cuando es recomendable, el quinto principio está sujeto a las particularidades de cada tipo de modelo QSAR. En este paso final de control y retroalimentación se sugiere, cuando sea posible, interpretación mecanicista o teórica, que suele implicar el análisis de los descriptores más significativos empleados en la modelación (Tropsha, 2010).

Es así como el modelado QSAR, como importante método alternativo a la experimentación animal es aprobado, bajo determinadas directrices, por entidades científicas y regulatorias. Su aplicación ha sido propuesta para la identificación de múltiples actividades toxicológicas que incluye a la disrupción endocrina. A continuación, se expone una revisión de los principales modelos QSAR disponibles para tres importantes mecanismos de disrupción endocrina.

La disrupción endocrina a través de métodos QSAR: selección de casos de estudio

El desarrollo de modelos QSAR depende de la información disponible, ya que sus inferencias se basan en la extrapolación de los datos existentes para predecir la actividad de compuestos no testeados. Esta es la razón por la cual el mayor número de estudios QSAR en el contexto de la disrupción endocrina se basa en el mecanismo más abordado, la acción de compuestos químicos como moduladores de los receptores estrogénicos.

En esta revisión se han querido compendiar, debido a su importancia, métodos QSAR recientes de otros mecanismos de interrupción del sistema endocrino. Como se encuentra esquematizado en la Figura 6, los tres ejemplos seleccionados representan las principales rutas

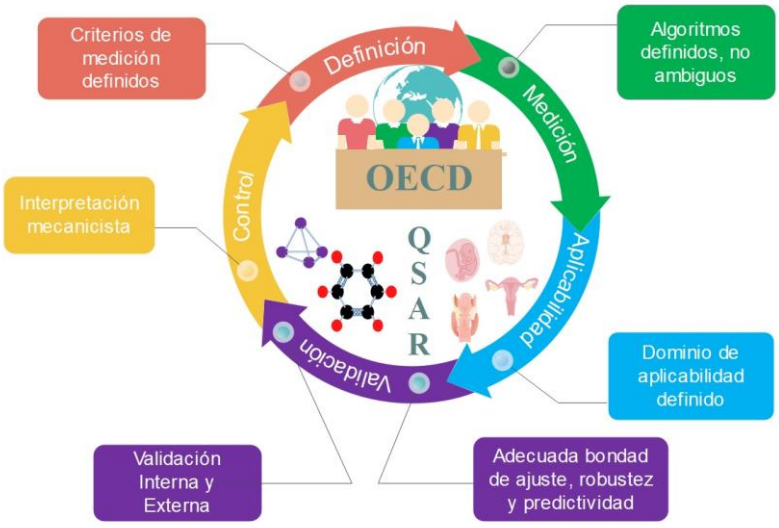


Figura 5: Principios establecidos por la OECD para la validación de los modelos QSAR.

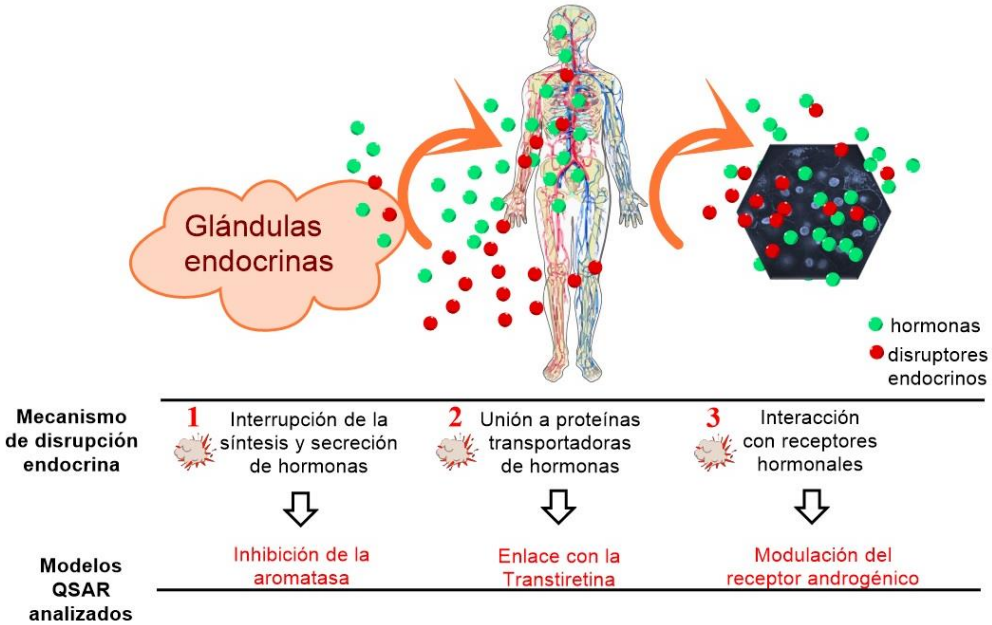


Figura 6: Mecanismos de disrupción endocrina seleccionados para el análisis de los modelos QSAR reportados en la literatura.

potenciales de toxicidad endocrina y en el contexto de hormonas estrogénicas, tiroideas y androgénicas, indistintamente.

En el primer mecanismo objeto de estudio, relacionado con la interrupción de la biosíntesis de estrógenos, se analizan los modelos QSAR desarrollados para predecir la inhibición de la enzima citocromo P450 aromatasa. Compitiendo con las hormonas tiroideas, la unión de compuestos químicos a la proteína transportadora transtiretina, o la interrupción de este mecanismo de transporte hormonal es la segunda ruta potencial de disrupción endocrina abordada. Por último, se analizan los más recientes métodos QSAR enfocados en la modulación, y especialmente el antagonismo sobre el receptor de andrógenos.

3.1 Estudios QSAR basados en los efectos sobre la enzima aromatasa

La interrupción de las rutas biosintéticas de hormonas es un mecanismo potencial de disrupción endocrina. Sin embargo, la información químico-biológica disponible hoy día procede en su mayoría de estudios farmacológicos (Mori et al., 2018). La principal aplicación terapéutica de la inhibición de la enzima P450 aromatasa ha sido en enfermedades neoplásicas asociadas a la producción de estrógenos como es el caso del cáncer de mama (Adhikari et al., 2017b).

Diversos estudios QSAR han pretendido dilucidar la relación entre los rasgos químico-estructurales y los efectos inhibidores de los compuestos sobre la CYP19A1. Los más significativos publicados en la última década se encuentran resumidos en la Tabla 1 a continuación.

De la modelación QSAR reportada entre 2010-2020 en la literatura basada en la inhibición de la enzima aromatasa y representada en los 37 ejemplos de la Tabla 1, destacan los siguientes elementos:

1. Los modelos lineales, particularmente la regresión lineal múltiple o el método de mínimos cuadrados parciales, son las metodologías estadísticas preferidas en el estudio QSAR de la inhibición de la enzima aromatasa, probablemente por su simplicidad e interpretabilidad.

2. Se ha apostado por la alta capacidad predictiva de los métodos de aprendizaje automático como redes neuronales o máquinas de soporte vectorial tanto en problemas de regresión como en problemas de clasificación.

3. Aun cuando la mayoría de los modelos han llevado a cabo la validación interna, muchos no fueron validados con el uso de series externas o con metodologías de 5 o 10-*folds* como es recomendado para garantizar la confiabilidad y capacidad predictiva.

4. En la mayoría de los modelos disponibles, los descriptores moleculares empleados son conocidos y fácilmente interpretables.

5. Metodologías innovadoras en la parametrización de las estructuras han sido propuestas como el análisis multivariante de imágenes empleando la transformada discreta bidimensional de Fourier o descriptores derivados de hipótesis toxicofóricas.

6. Aun cuando la complejidad y el volumen de los datos ha ido en aumento, el uso de bases de datos de congéneres con limitado dominio de aplicabilidad sigue siendo habitual. Especies químicas como flavonoides, cumarinas, benzimidazoles, bis-sulfonamidas, naftoquinonas y arilsulfonamidas han sido modeladas con sus respectivos derivados estructurales cercanos en series que no sobrepasan los 60 compuestos químicos.

7. Hasta el momento, la base de datos más diversa reportada en la inhibición de la enzima aromatasa cuenta con 973 compuestos, e incluye esteroides y estructuras no esteroidales. Modelos de regresión y de clasificación han sido diseñados a partir de esta base de datos y estrictamente validados para la predicción de nuevas entidades con actividad desconocida.

Una de las principales aplicaciones de los modelos computacionales, y en particular de los estudios QSAR, es el cribado virtual de grandes bases de datos de compuestos con la finalidad de encontrar los llamados "compuestos líderes" de la actividad modelada. Esta utilidad, particularmente ventajosa en el contexto farmacológico, ha sido aprovechada por varios estudios de predicción de los efectos de compuestos químicos sobre la enzima aromatasa.

Dawood *et al*. cribaron 1 720 constituyentes fitoquímicos presentes en 29 plantas medicinales y otros productos naturales usados en la medicina tradicional egipcia. La disrupción endocrina y/o el potencial terapéutico de estos compuestos naturales mediada por la inhibición de la enzima aromatasa, fue predicha de esta forma empleando modelos QSAR (Dawood et al., 2018). En el trabajo de Xie *et al*., el cribado virtual de la "NCI2000 *database*" lo desarrollaron con los modelos farmacofóricos previamente y la actividad inhibitoria de los seis compuestos identificados fue predicha a través de los modelos 3D-QSAR diseñados (Xie et al., 2014). Barigye *et al*. cribaron 1 593 compuestos y realizaron la validación experimental *in vitro* de 10 sustancias predichas como inhibidores activos de la aromatasa según el consenso mayoritario de los modelos que propusieron. Esta última constituye la más rigurosa validación del poder predictivo de los modelos QSAR, conocida como validación experimental prospectiva (Barigye et al., 2018).

Finalmente, vale la pena señalar, que no solo la inhibición de la enzima aromatasa ha sido considerada variable respuesta en el estudio de la disrupción endocrina por este mecanismo. La habilidad de actuar como ligandos de la enzima, y que no implica información acerca de sus efectos agonistas/antagonistas ha sido también recomendada en el análisis toxicológico. Como ejemplo representativo, Du H *et al.* modelaron la capacidad de enlace a la aromatasa de 1 552 compuestos diversos obteniendo una elevada robustez y predictividad en los modelos QSAR resultantes (Du et al., 2017). Estas estimaciones son importantes en las fases preliminares de priorización de compuestos, así como en el análisis de los riesgos potenciales. Sin embargo, modelos que logren predecir el efecto consecuente de la interacción con la enzima aportan una información mucho más relevante desde el punto de vista biológico.

3.2 Estudios QSAR basados en los efectos sobre la transtiretina

Varios modelos QSAR han pretendido dilucidar la relación entre xenobióticos, fundamentalmente contaminantes ambientales, y la proteína transtiretina, encargada del transporte de la hormona tiroidea. Los modelos de regresión en su mayoría están basados en porcentajes de inhibición de la unión transtiretina-tiroxina, o valores de IC_{50} para los compuestos objeto de análisis. Mientras tanto los estudios categóricos suelen basarse en resultados de ensayos de potencia competitiva con la hormona, asignando dos o más clases a estos efectos (ej. activo/inactivo o bajo/moderado/alto) (Kar et al., 2017). En la Tabla 2 se encuentran resumidos los principales modelos QSAR de disrupción del mecanismo de transporte de la hormona tiroxina.

Algunos elementos destacables en la modelación QSAR de la disrupción de la TTR son:

1. La mayor parte de los compuestos cuya evaluación experimental se encuentra disponible para la modelación son sustancias que, por otros mecanismos, han sido sugeridas como potenciales interruptores endocrinos, ej. poli y perfluorocarbonos (PFCs) y los polibromodifenil éteres (PBDEs).

2. Descriptores interpretables han sido empleados en todos los trabajos con la finalidad de dilucidar su relación con la disrupción de la transtiretina.

3. El escaso volumen de información disponible para este mecanismo conlleva a que la regresión lineal, especialmente el método de PLS y la clasificación basada en k-vecinos más cercanos (técnicas además muy interpretables), sean las metodologías estadísticas más comúnmente empleadas.

Tabla 1. *Modelos QSAR de compuestos inhibidores de la aromatasa.*

n.º	Base de Datos [a]	Descriptores [b]	Método QSAR	Validación [c]	Ref.
1	116 compuestos diversos	Algunos de los siguientes: Jurs_FNSA_3+0.063, NCOSV, Hbondacceptor-2, 4.134-AlogP, Jurs_PNSA_3+34.086, AlogP-4.273, Jurs_FNSA_1-0.414, Chiralcenters.	3 modelos GFA (regresión)	R^2=0.68-0.71, Q^2_{int}=0.64-0.69, Q^2_{ext}=0.62-0.67	(Roy and Roy, 2010)
			G/PLS (regresión)	R^2=0.69, Q^2_{int}=0.63, Q^2_{ext}=0.63	
2	57 flavonoides	Parámetros energéticos y electrónicos del enlace ligando-receptor	2 modelos SW-MLR (regresión)	R^2=0.82-0.87, Q^2_{int}=0.63-0.79, Q^2_{ext}=0.81-0.83	(Narayana et al., 2012)
3	280 esteroides	MW, RBN, nCIC, Q_m, nHDon, nHAcc, TPSA, HOMO, LUMO, LogP, Energy, HOMO-LUMO gap, dipole moment	DT (clasificación)	Acc=71.67 % Sn=0.76 Sp=0.67	(Nantasenamat et al., 2013a)
4	690 no-esteroides			Acc=76.79 % Sn=0.58 Sp=0.82	
5	47 triazoles (análogos del letrozol)	-Número de anillos -ALogP -HOMO-LUMO	MLR (regresión)	R^2=0.81, Q^2_{int}=0.76, Q^2_{ext}=0.65	(Nantasenamat et al., 2013b)
6			ANN (regresión)	R^2=0.82, Q^2_{int}=0.76, Q^2_{ext}=0.65	
7			SVM (regresión)	R^2=0.88, Q^2_{int}=0.83, Q^2_{ext}=0.66	
8	12 benzimidazoles	E_ADJ_equ, SC_1, CIC, Jurs_TASA, Shadow_XZ	GFA-PLS (regresión)	R^2=0.99, Q^2_{int}=0.96	(Dai et al., 2014)
9	44 flavonoides	Algunos o todos los descriptores siguientes: -RBN -nCIC -nHDon -nHAcc -ALogP -Energy -Dipole moment	MLR (regresión)	n=31 R^2=0.99, Q^2_{int}=0.99, Q^2_{ext}=0.99	(Nantasenamat et al., 2014)
10			ANN (regresión)	n=30 R^2=0.99, Q^2_{int}=0.98, Q^2_{ext}=0.99	
11			SVM (regresión)	n=33 R^2=0.99, Q^2_{int}=0.98, Q^2_{ext}=0.98	
12			DT (clasificación)	n=26 Acc=84.62% Sn=0.85	
13	973 compuestos diversos	Descriptores basados en SMILES	Método Monte Carlo (regresión)	R^2=0.63–0.71 Q^2_{int}=0.62–0.70 Q^2_{ext}=0.61-0.66	(Worachartcheewan et al., 2014a)
14	34 cumarinas disustituidas	F10[N-O], MAXDP BELe1, Inflammat-50, B10[C-O], H-047, Psychotic-80.	MLR (regresión)	R^2=0.96 Q^2_{int}=0.92 Q^2_{ext}=0.73	(Worachartcheewan et al., 2014b)
15	66 esteroides	descriptores CoMFA	PLS c=10 (regresión)	R^2=0.99 Q^2_{int}=0.66 Q^2_{ext}=0.64	(Xie et al., 2014)
16		descriptores CoMSIA	PLS c=17 (regresión)	R^2=0.99 Q^2_{int}=0.60 Q^2_{ext}=0.84	
17	45 flavonoides	Descriptores CoMFA	PLS c=6 (regresión)	R^2=0.92, Q^2_{int}=0.83, Q^2_{ext}=0.71	(Awasthi et al., 2015)
18	180 esteroides	C-025, ESpm13r, ESpm14u, ESpm10r, ESpm12x, ESpm15d, Spm10x, H-050, nBM, MATS6p, MATS6e, GATS6m, GATS6p, piPC07, GGI1	Efficient linear method (ELM) (clasificación)	Acc=80.83 ± 0.71% Sn=0.88±0.02 Sp=0.75±0.03 MCC=0.63±0.01	(Shoombuatong et al., 2015)
19	474 diversos (no esteroides)			Acc=80.76± %0.33 Sn=0.83±0.01 Sp=0.73±0.01 MCC=0.54±0.01	
20	84 diversos (no esteroides)	CoMFA (modelo farmacofórico)	PLS c=7 (regresión)	R^2=0.99 Q^2_{int}=0.74 Q^2_{ext}=0.63	(Xie et al., 2015)
21		CoMSIA (modelo farmacofórico)	PLS c=6 (regresión)	R^2=0.93 Q^2_{int}=0.71 Q^2_{ext}=0.67	
22	76 compuestos: -diarilalquilimidazoles -diarilalquiltriazoles	nTB, BEHv2, ATS3m, ATS7m, nCp, G(N…N), Hyd.E, G(O…O), SRW07	MLR (regresión)	R^2=0.83 R^2_{pred}=0.70 Q^2_{ext}=0.91	(Ghodsi and Hemmateenejad, 2016)
23	67 no esteroides (análogos del letrozol)	SaaN, JGI7, MATS8c, CLogP, CMR	SW-MLR (regresión)	R^2=0.90 Q^2_{int}=0.86 Q^2_{ext}=0.85	(Adhikari et al., 2017a)
24		*"fingerprints"* moleculares (hologramas)	PLS c=6 (regresión)	R^2=0.87 Q^2_{int}=0.76 Q^2_{ext}=0.61	
25		Fragmentos Subestructurales	Model bayesiano (clasificación)	Acc=88.0% Sen=0.89 Spe=0.88	
26		descriptores CoMFA	PLS c=7 (regresión)	R^2=0.94 Q^2_{int}=0.54 Q^2_{ext}=0.62	
27	11 compuestos (1,4-naftoquinonas)	Mor04m, H8m, Mor08e, G1v, SIC2	MLR	R^2=1.00 Q^2_{int}=0.98	(Prachayasittikul et al., 2017)

28	973 compuestos diversos	Descriptores basados en el análisis multivariado de imágenes (MIA) empleando la transformada discreta bidimensional de Fourier (2D-DFT)	ANN (clasificación)	Acc=88.74% Sn=0.86 Sp=0.91	(Barigye et al., 2018)
29			LDA (clasificación)	Acc=84.23% Sn=0.72 Sp=0.95	
30			SVM (clasificación)	Acc=85.14% Sn=0.76 Sp=0.93	
31			BT (clasificación)	Acc=84.68% Sn=0.81 Sp=0.88	
32			kNN (clasificación)	Acc=85.59% Sn=0.82 Sp=0.88	
33	16 esteroides	Descriptores derivados de hipótesis farmacofóricas (PHASE)	PLS c=3 (regresión)	R^2=1.00 Q^2_{int}=0.49 Q^2_{ext}=0.21	(Dawood et al., 2018)
34	25 no esteroides		PLS c=5 (regresión)	R^2=1.00 Q^2_{int}=0.34 Q^2_{ext}=0.09	
35	17 bis-sulfonamidas	GATS6v, Mor03m	MLR (regresión)	R^2=0.80 Q^2_{int}=0.68	(Leechaisit et al., 2019)
36	30 arilsulfonamidas	aLogP, HBA, HBD, RB, HAC, RC, PSA, E-state, MR, Polar	MLR (regresión)	R^2=0.83 Q^2_{int}=0.76	(Fantacuzzi et al., 2020)

[a] Número de compuestos usados en la modelación (incluyendo series de entrenamiento y de validación)
[b] Descriptores que se incluyeron en los modelos finales. Para más detalles, se recomienda consultar las referencias de cada modelo o el *Handbook* (Todeschini and Consonni, 2000)
[c] En modelos de regresión: el coeficiente de correlación (R^2), el coeficiente de validación interna (generalmente resultantes de la validación cruzada) (Q^2_{int}) y el de validación externa (Q^2_{ext}). En modelos de clasificación, solamente se muestran los resultados de la validación con la serie de predicción a través de la exactitud (Acc), sensibilidad (Sn), especificidad (Sp) y el coeficiente de correlación de Matthews (MCC).

Tabla 2. *Modelos QSAR de compuestos moduladores de la transtiretina*.

n.º	Base de Datos [a]	Descriptores [b]	Método QSAR	Validación [c]	Ref.
1	24 poli y perfluorocarbonos (PFCs)	Diversos: -propiedades moleculares -índices topológicos y de carga -tiempos de retención (HPLC)	PLS c=2	R^2=0.61 Q^2_{int}=0.41	(Weiss et al., 2009)
2	17 Polibromodifenil éteres (PBDEs)	Qpmax, MATS6v	MLR	R^2=0.96 Q^2_{int}=0.93 Q^2_{ext}=0.90	(Papa et al., 2010)
3	29 PBDEs	DISPe, nArOH	k-NN k=3	n=20 Acc_{clase1} = 87.5% Acc_{clase2} = 100% Acc_{clase3} = 100% Sn=1.00 Sp=0.87	(Kovarich et al., 2011)
			k-NN k=3	n=29 Acc_{clase1} = 83.3% Acc_{clase2} = 88.9% Acc_{clase3} = 100% Sn=0.94 Sp=0.83	
4	28 PBDEs	Descriptores CoMSIA	PLS c=4	R^2=0.98, Q^2_{int}=0.75, Q^2_{ext}=0.93	(Yang et al., 2011)
5	19 PFCs	AMW, HATS6m	k-NN k=1	Acc=100% Sn= Sp=1.00	(Kovarich et al., 2012)
		nH, HATS6m		Acc=100% Sn= Sp=1.00	
		nH, F06[C-O]		Acc=90% Sn=1.00, Sp=0.75	
		T(F..F), HATS6m		Acc=100% Sn= Sp=1.00	
6	53 halogenados (PFCs & PBDEs)	nArOH, (F03[Br-Br]), HATS6m	k-NN k=5	n=53 Acc=89% Sn=1.00, Sp=0.86	(Papa et al., 2013)
7		R5u, F07[C-O], nArOH	MLR	n=32 R^2=0.89, Q^2_{int}=0.81	
8	47 compuestos -36 fenólicos -11 no ionizables	Diversos: Ej: log D, MW, nX, E_{HOMO}, E_{LUMO}, qH^+, qC^-, qO^-	PLS c=2	R^2=0.86, Q^2_{int}=0.84, Q^2_{ext}=0.93	(Yang et al., 2013)
9	178 compuestos diversos	14 descriptores 2D -Propiedades fisicoquímicas ej. hidrofobicidad, carga parcial. -conteo de fragmentos: ej. hidroxilos, átomos de halógeno	PLS c=5	Acc=79% Sn=0.94 Sp=0.69	(Zhang et al., 2015)
10			kNN k=4	Acc=82% Sn=0.78 Sp=0.85	
11			SVM	Acc=77% Sn=0.90 Sp=0.73	
12	15 PFCs	IC3, $\sum \beta'_S$	GFA-MLR	R^2=0.86, Q^2_{int}=0.64, Q^2_{ext}=0.73	(Kar et al., 2017)

13	24 PFCs	Me, nCsp2, H-050	LDA	Acc=100% Sn=1.00 Sp=1.00 MCC=0.87	(Kar et al., 2017)
14	29 compuestos -24 PFCs -6 ácidos grasos	HATS6m, qO^-, δ_A-	PLS	R^2=0.93, Q^2_{int}=0.67, Q^2=0.65	(Yang et al., 2017)

[a] Número de compuestos usados en la modelación (incluyendo series de entrenamiento y de validación)
[b] Descriptores que se incluyeron en los modelos finales. Para más detalles, se recomienda consultar las referencias de cada modelo o el *Handbook* (Todeschini and Consonni, 2000)
[c] En modelos de regresión: el coeficiente de correlación (R^2), el coeficiente de validación interna (generalmente resultantes de la validación cruzada) (Q^2_{int}) y el de validación externa (Q^2_{ext}). En modelos de clasificación, solamente se muestran los resultados de la validación con la serie de predicción a través de la exactitud (Acc), sensibilidad (Sn) y especificidad (Sp).

El estudio de clasificación de Zhang *et al*. es posiblemente el más completo hasta el momento para este mecanismo debido al número de estructuras y los diversos métodos aplicados. Los autores desarrollaron además un cribado virtual y seleccionaron un grupo de 23 compuestos para llevar a cabo una validación experimental *in vitro* de los efectos que denominaron "alteradores de la hormona tiroidea" (mediados por la TTR). En el cribado se analizaron 485 contaminantes orgánicos presentes en el polvo que fueron extraídos de la literatura y 433 potenciales metabolitos -determinados *in silico*- de los mismos. Cuatro nuevos compuestos químicos interruptores fueron identificados combinando las metodologías *in silico*/*in vitro*. En este trabajo se sugirió además la importancia de la activación metabólica para el enlace a la transtiretina (Zhang et al., 2015).

Por otro lado, los estudios de Yang *et al*. han dilucidado la importancia de las formas químicas y la ionización de éstas en las interacciones con TTR. El primer trabajo estuvo enfocado en compuestos fenólicos mientras que el siguiente abordó diversos PCFs. En ambos estudios se concluyó que las diferencias entre formas neutras y aniónicas de los compuestos influyen en la capacidad de enlace con la proteína transportadora TTR (Yang et al., 2017, 2013).

3.3 Estudios QSAR basados en los efectos sobre el receptor de andrógenos

Los andrógenos, entre otras muchas funciones, participan en el desarrollo y el mantenimiento de la próstata. La expresión del receptor androgénico es por tanto una importante diana terapéutica en patologías y malignidades prostáticas, en las cuales se han enfocado diversos estudios de descubrimiento de fármacos. Además, dada su notable importancia fisiológica, la inhibición del AR deriva en reacciones adversas que conllevan a su inclusión como un potencial mecanismo de disrupción endocrina. Sin embargo, la información actual disponible ha derivado en su mayoría de estudios farmacológicos enfocados en el tratamiento del cáncer de próstata a través del efecto anti androgénico de compuestos químicos (Heinlein and Chang, 2004). Los más recientes estudios QSAR enfocados en la inhibición del receptor de estrógenos se encuentran resumidos en la Tabla 3.

La predicción del antagonismo sobre el receptor androgénico ha sido estimada empleando métodos computacionales para grandes bases de datos de compuestos cuya información biológica deriva de ensayos *in vitro* principalmente (Vinggaard et al., 2008). En la última década el estudio de Li *et al*. destaca debido al amplio espacio químico modelado que lo sitúa como una importante herramienta predictiva del antagonismo sobre el receptor androgénico tanto en el panorama farmacológico como toxicológico. Los autores de este trabajo fusionaron varias estrategias de cribado virtual y demostraron la efectividad de esta combinación en comparación con metodologías clásicas (H. Li et al., 2013).

Otros trabajos recientes han aportado modelos de predicción que, aun con un menor número de compuestos, permiten la estimación del efecto inhibitorio en % relativos o en IC_{50}. Son especialmente importantes desde la perspectiva de la disrupción endocrina, la predicción de derivados de contaminantes (ej. PCBs, PBDEs) o de compuestos presentes en altas dosis en la dieta humana como los flavonoides.

Una combinación de las diferentes interacciones ligando-receptor a través de metodologías de dinámica molecular fue propuesta por Wu Y *et al.* en la clasificación de compuestos activos/inactivos sobre el receptor androgénico. La combinación de estas simulaciones con estudios QSAR resultó en una significativa mejora de la capacidad predictiva de los modelos respecto a metodologías QSAR convencionales (Wu et al., 2016). Sin embargo, este estudio fue desarrollado exclusivamente con flavonoides, por tanto, se necesitan pruebas adicionales para asumir generalizaciones o corroborar la aplicabilidad que tiene esta propuesta en un espacio químico más amplio.

A propósito de esta necesidad, en un trabajo de Trisciuzzi *et al.* se sugiere un innovador y práctico protocolo para el desarrollo de modelos *in silico* altamente predictivos como clasificadores de la actividad androgénica. Estos autores emplearon el acoplamiento molecular (conocido como *docking*), que consiste en la predicción de la energía y de los modos de enlace entre ligandos y proteínas . La exigente validación externa de los modelos y la aplicación de éstos en el cribado de más de 55 mil compuestos químicos relevantes (debido al grado de exposición humana a los mismos), corroboró su capacidad predictiva. Además, la integración de diferentes métodos computacionales se definió como una importante pauta para la interpretación mecanicista de los resultados (Trisciuzzi et al., 2017).

Por otro lado, desde hace varias décadas, diferentes métodos QSAR han sido empleados en la predicción de la capacidad de enlace al AR, la cual resulta útil fundamentalmente en análisis preliminares de riesgo (Loughney and Schwender, 1992; Waller et al., 1996).

Conclusiones

Miles de productos químicos y mezclas que hoy día se emplean en alimentos, suplementos nutricionales, fármacos, cosméticos, envases, productos agrícolas, etc. representan un riesgo potencial como interruptores endocrinos. La evaluación del riesgo de disrupción endocrina es altamente compleja, y las tentativas de aunar esfuerzos para el análisis y la legislación de estos tóxicos son aún insuficientes. Además, la información experimental disponible es limitada y en algunos casos contradictoria, incrementando las dificultades en el establecimiento de pautas apropiadas.

Considerando el número significativo de compuestos químicos con potencial efecto tóxico sobre el sistema endocrino, resulta necesario y ventajoso el uso de métodos alternativos que garanticen el análisis rápido, certero y menos costoso de sustancias. Los modelos computacionales no sólo permiten a los investigadores reducir el número de experiencias en el laboratorio, sino que además asisten y extraen la información relevante de los resultados experimentales.

El empleo de metodologías predictivas, particularmente modelos quimioinformáticos es recomendado en todas las normativas vigentes para el control toxicológico de compuestos químicos. Desde hace algunos años, diversos estudios QSAR han sido descritos en la predicción de la disrupción endocrina.

Los modelos QSAR empleados en la predicción de la actividad inhibitoria sobre la enzima aromatasa han sido revisados (Adhikari et al., 2017c; Shoombuatong et al., 2018). De igual forma, varias revisiones han considerado de forma general los mecanismos de disrupción endocrina y la importancia de las metodologías QSAR para

Tabla 3. *Modelos QSAR de compuestos antagonistas del receptor androgénico.*

n.º	Base de Datos [a]	Descriptores [b]	Método QSAR	Validación [c]	Ref.
1	1220 compuestos diversos	De 5 a 30 descriptores diversos INDUCTIVE MOE & DRAGON	DT	Acc=77.60% Sn=0.74 Sp=0.71	(H. Li et al., 2013)
2			ANN	Acc=80.90% Sn=1.00 Sp=0.79	
3			agregación de *Bootstrap* (*bagging*)	Acc=80.90% Sn=0.92 Sp=0.71	
4			kNN	Acc=70.80% Sn=0.81 Sp=0.71	
5	23 PCBs	Descriptores CoMSIA	PLS c=6	R^2=0.95, Q^2_{int}=0.67	(X. Li et al., 2013)
6	60 compuestos diversos	análisis de campo molecular (MFA) CH3/334, H+/467, CH3/543, H+/600, CH3/193, CH3/187, CH3/606	PLS c=8	R^2=0.84, Q^2_{int}=0.79	(Suresh, 2013)
7		análisis de superficie del receptor (RSA) TOT/1380, TOT/1104, TOT/2615, TOT/1618, TOT/1974, TOT/2150, TOT/2344		R^2=0.91, Q^2_{int}=0.86	
8		descriptors 2D CH3/77, CH3/156, CH3/127, CH3/141, H+/171		R^2=0.86, Q^2_{int}=0.74	
9	53 flavonoides	Descriptores CoMSIA	PLS c=3	R^2=0.95 Q^2_{int}=0.60	(Wu et al., 2016)
10	20 bisphenols	nROH, $V_{s,max}$, E_{LUMO}	MLR	R^2=0.92 Q^2_{int}=0.82 Q^2_{ext}=0.85	(Yang et al., 2016)
11	36 derivados 7α sustituidos de DHT	IC5, GATS5e, DISPp, HATS3u	GA-MLR	R^2=0.76 Q^2_{int}=0.66	(Wang et al., 2017)
11	21 PBDEs	Descriptores CoMFA	PLS c=1	R^2=0.69 Q^2_{int}=0.38	(Wu et al., 2017)
12		Descriptores CoMSIA	PLS c=1	R^2=0.61 Q^2_{int}=0.23	

[a] Número de compuestos usados en la modelación (incluyendo series de entrenamiento y de validación)
[b] Descriptores que se incluyeron en los modelos finales. Para más detalles, se recomienda consultar las referencias de cada modelo o el *Handbook* (Todeschini and Consonni, 2000)
[c] En modelos de regresión: el coeficiente de correlación (R^2), el coeficiente de validación interna (generalmente resultantes de la validación cruzada) (Q^2_{int}) y el de validación externa (Q^2_{ext}). En modelos de clasificación, solamente se muestran los resultados de la validación con la serie de predicción a través de la exactitud (Acc), sensibilidad (Sn) y especificidad (Sp).

el análisis de riesgo y la predicción de la toxicidad (Vuorinen et al., 2015). Además, la disrupción del receptor de estrógenos, a través de múltiples variables respuesta y bioensayos, se ha modelado en diversas ocasiones (Porta et al., 2016) y sus resultados, junto a otros receptores nucleares y diversas técnicas computacionales se han revisado también (Ruiz et al., 2017). Sin embargo, esta es la primera vez, que, a nuestro conocimiento, se revisan los modelos QSAR disponibles en el estudio de la disrupción de la TTR. También es el primer compendio que analiza, en forma de casos de estudio, exclusivamente la modelación QSAR de la disrupción endocrina mediada por los tres mecanismos de: inhibición de la aromatasa, modulación de la transtiretina y del receptor androgénico.

Muchos de los modelos disponibles para estos tres mecanismos se encuentran rigurosamente validados y sus predicciones pueden contribuir en gran medida al estudio de la disrupción endocrina. Especialmente importante es el uso de las herramientas QSAR en la selección de los compuestos a probar de forma experimental. Además, las predicciones combinadas de estos mecanismos y otros como los estrogénicos pueden proveer de una visión general que garantice la prohibición de sustancias altamente preocupantes.

Agradecimientos

La presente revisión bibliográfica fue realizada como contribución al proyecto PROTECTED (http://protected.eu.com/), financiado por el programa de investigación e innovación H2020 Marie Skłodowska-Curie de la Unión Europea No. 722634.

Bibliografía

1. *Adhikari, N., Amin, S.A., Jha, T., Gayen, S.*, 2017a. Integrating regression and classification-based QSARs with molecular docking analyses to explore the structure-antiaromatase activity relationships of letrozole-based analogs. Can. J. Chem. 95, 1285–1295. https://doi.org/10.1139/cjc-2017-0419

2. *Adhikari, N., Amin, S.A., Saha, A., Jha, T.*, 2017b. Combating breast cancer with non-steroidal aromatase inhibitors (NSAIs): Understanding the chemico-biological interactions through comparative SAR/QSAR study. Eur. J. Med. Chem. 137, 365–438. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.041

3. *Adhikari, N., Amin, S.A., Saha, A., Jha, T.*, 2017c. Combating breast cancer with non-steroidal aromatase inhibitors (NSAIs): Understanding the chemico-biological interactions through comparative SAR/QSAR study. Eur. J. Med. Chem. 137, 365–438. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.041

4. *Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V.P., Dwivedi, U.N.*, 2015. Molecular docking and 3D-QSAR-based virtual screening of flavonoids as potential aromatase inhibitors against estrogen-dependent breast cancer. J. Biomol. Struct. Dyn. 33, 804–819. https://doi.org/10.1080/07391102.2014.912152

5. *Balaguer, P., Delfosse, V., Bourguet, W.*, 2019. Mechanisms of endocrine disruption through nuclear receptors and related pathways. Curr. Opin. Endocr. Metab. Res. 7, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.04.008

6. *Barigye, S.J., Freitas, M.P., Ausina, P., Zancan, P., Sola-Penna, M., Castillo-Garit, J.A.*, 2018. Discrete Fourier Transform-Based Multivariate Image Analysis: Application to Modeling of Aromatase Inhibitory Activity. ACS Comb. Sci. 20, 75–81. https://doi.org/10.1021/acscombsci.7b00155

7. *Bern, H., Blair, P., Brasseur, S., Colborn, T., Cunha, G., Davis, W., Al, E.*, 1991. Statement from the Work Session on Chemically Induced Alterations in Sexual Development: the Wildlife/human

Connectionitle, in: The Wingspread Conference. Racine, Wisconsin.

8. *Brown, A.C., Fraser, T.R.*, 1868. On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action; with special reference to the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia. J. Anat. Physiol. 2, 224–242.

9. *Cheek, A.O., Kow, K., Chen, J., McLachlan, J.A.*, 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. Environ. Health Perspect. 107, 273–278. https://doi.org/10.1289/ehp.99107273

10. *Cherkasov, A., Muratov, E.N., Fourches, D., Varnek, A., Baskin, I.I., Cronin, M., Dearden, J., Gramatica, P., Martin, Y.C., Todeschini, R., Consonni, V., Kuz'Min, V.E., Cramer, R., Benigni, R., Yang, C., Rathman, J., Terfloth, L., Gasteiger, J., Richard, A., Tropsha, A.*, 2014. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? J. Med. Chem. 57, 4977–5010. https://doi.org/10.1021/jm4004285

11. *Cramer, R.D., David E, P., Bunce, J.D.*, 1988. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. J. Am. Chem. Soc 110, 5959–5967. https://doi.org/10.1021/ja00226a005

12. *Dai, Y., Xiao, Q., Wang, S., Wei, X., Zhang, Z., Ma, H., Zheng, M., Hou, M., Zhang, T.*, 2014. Syntheses and QSAR Studies of Benzylimidazole Derivatives and Benzylcarbazole as Potential Aromatase Inhibitors. Asian J. Chem. 26, 70–73. https://doi.org/10.1093/jae/ejp002

13. *Dawood, H.M., Ibrahim, R.S., Shawky, E., Hammoda, H.M., Metwally, A.M.*, 2018. Integrated in silico-in vitro strategy for screening of some traditional Egyptian plants for human aromatase inhibitors. J. Ethnopharmacol. 224, 359–372. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.009

14. *de Ávila, R.I., Lindstedt, M., Valadares, M.C.*, 2019. The 21st Century movement within the area of skin sensitization assessment: From the animal context towards current human-relevant in vitro solutions. Regul. Toxicol. Pharmacol. 108, 104445. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104445

15. *Delgado, L.F., Charles, P., Glucina, K., Morlay, C.*, 2012. QSAR-like models: A potential tool for the selection of PhACs and EDCs for monitoring purposes in drinking water treatment systems - A review. Water Res. 46, 6196–6209. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.016

16. *Du, H., Cai, Y., Yang, H., Zhang, H., Xue, Y., Liu, G., Tang, Y., Li, W.*, 2017. In Silico Prediction of Chemicals Binding to Aromatase with Machine Learning Methods. Chem. Res. Toxicol. 30, 1209–1218. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00037

17. *Dudek, A., Arodz, T., Galvez, J.*, 2006. Computational Methods in Developing Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR): A Review. Comb. Chem. High Throughput Screen. 9, 213–228. https://doi.org/10.2174/138620706776055539

18. *Fantacuzzi, M., De Filippis, B., Gallorini, M., Ammazzalorso, A., Giampietro, L., Maccallini, C., Aturki, Z., Donati, E., Ibrahim, R.S., Shawky, E., Cataldi, A., Amoroso, R.*, 2020. Synthesis, biological evaluation, and docking study of indole aryl sulfonamides as aromatase inhibitors. Eur. J. Med. Chem. 185, 111815. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111815

19. *Gassner, F.X., Reifenstein, E.C.J., Algeo, J.W., Mattox, W.E.*, 1958. Effects of hormones on growth, fattening, and meat production potential of livestock. Recent Prog. Horm. Res. 14, 183–187.

20. *Ghodsi, R., Hemmateenejad, B., 2*016. QSAR study of diarylalkylimidazole and diarylalkyltriazole aromatase inhibitors. Med. Chem. Res. 25, 834–842. https://doi.org/10.1007/s00044-016-1530-1

21. *Gozalbes, R., de Julián-Ortiz, J.V., Fito-López, C.*, 2015. Métodos computacionales en toxicología predictiva: Aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH. Rev. Toxicol. 31, 157–167.

22. *Heinlein, C.A., Chang, C.*, 2004. Androgen Receptor in Prostate Cancer. Endocr. Rev. 25, 276–308. https://doi.org/10.1210/er.2002-0032

23. *Hong, H., Branham, W.S., Ng, H.W., Moland, C.L., Dial, S.L., Fang, H., Perkins, R., Sheehan, D., Tong, W.*, 2015. Human sex hormone-binding globulin binding affinities of 125 structurally diverse chemicals and comparison with their binding to androgen receptor, estrogen receptor, and α-Fetoprotein. Toxicol. Sci. 143, 333–348. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu231

24. *Kar, S., Sepúlveda, M.S., Roy, K., Leszczynski, J.*, 2017. Endocrine-disrupting activity of per- and polyfluoroalkyl substances: Exploring combined approaches of ligand and structure based modeling. Chemosphere 184, 514–523. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.024

25. *Karjalainen, T., Hoeveler, A., Draghia-Akli, R.*, 2017. European Union research in support of environment and health: Building scientific evidence base for policy. Environ. Int. 103, 51–60. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.03.014

26. *Kovarich, S., Papa, E., Gramatica, P.*, 2011. QSAR classification models for the prediction of endocrine disrupting activity of brominated flame retardants. J. Hazard. Mater. 190, 106–112. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.008

27. *Kovarich, S., Papa, E., Li, J., Gramatica, P.*, 2012. QSAR classification models for the screening of the endocrine-disrupting activity of perfluorinated compounds. SAR QSAR Environ. Res. 23, 207–220. https://doi.org/10.1080/1062936X.2012.657235

28. *Leblebicioglu, B., Connors, J., Mariotti, A.*, 2013. Principles of endocrinology. Periodontol. 2000 61, 54–68. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00440.x

29. *Leechaisit, R., Pingaew, R., Prachayasittikul, Veda, Worachartcheewan, A., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, Virapong*, 2019. Synthesis, molecular docking, and QSAR study of bis-sulfonamide derivatives as potential aromatase inhibitors. Bioorganic Med. Chem. 27, 115040. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.08.001

30. *Li, H., Ren, X., Leblanc, E., Frewin, K., Rennie, P.S., Cherkasov, A.*, 2013. Identification of novel androgen receptor antagonists using structure- and ligand-based methods. J. Chem. Inf. Model. 53, 123–130. https://doi.org/10.1021/ci300514v

31. *Li, X., Ye, L., Wang, X., Shi, W., Liu, H., Qian, X., Zhu, Y., Yu, H.*, 2013. In silico investigations of anti-androgen activity of polychlorinated biphenyls. Chemosphere 92, 795–802. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.022

32. *Lin, Xiaoqian, Li, X., Lin, Xubo*, 2020. A review on applications of computational methods in drug screening and design. Molecules 25, 1–18. https://doi.org/10.3390/molecules25061375

33. *Little, A.G.*, 2016. A review of the peripheral levels of regulation by thyroid hormone. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 186, 677–688. https://doi.org/10.1007/s00360-016-0984-2

34. *Loughney, D.A., Schwender, C.F.*, 1992. A comparison of progestin and androgen receptor binding using the CoMFA technique. J. Comput. Aided. Mol. Des. 6, 569–581. https://doi.org/10.1007/BF00126215

35. *McEwan, I.J.*, 2016. The Nuclear Receptor Superfamily at Thirty, in: The Nuclear Receptor Superfamily. Springer Science+Business Media, New York, pp. 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-575-0

36. *Miller WL*, 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr. Rev. 9, 295–318.

37. *Mori, T., Ito, F., Koshiba, A., Kataoka, H., Tanaka, Y., Okimura, H., Khan, K.N., Kitawaki, J.*, 2018. Aromatase as a target for treating endometriosis. J. Obstet. Gynaecol. Res. 44, 1673–1681. https://doi.org/10.1111/jog.13743

38. *Nantasenamat, C., Li, H., Mandi, P., Worachartcheewan, A., Monnor, T., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Prachayasittikul, V.*, 2013a. Exploring the chemical space of aromatase inhibitors. Mol. Divers. 17, 661–677. https://doi.org/10.1007/s11030-013-9462-x

39. *Nantasenamat, C., Worachartcheewan, A., Mandi, P., Monnor, T., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Prachayasittikul, V.*, 2014. QSAR modeling of aromatase inhibition by flavonoids using machine learning approaches. Chem. Pap. 68, 697–713. https://doi.org/10.2478/s11696-013-0498-2

40. *Nantasenamat, C., Worachartcheewan, A., Prachayasittikul, S., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Prachayasittikul, V.*, 2013b. QSAR modeling of aromatase inhibitory activity of 1-substituted 1,2,3-triazole analogs of letrozole. Eur. J. Med. Chem. 69, 99–114. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.015

41. *Narayana, B.L., Pran Kishore, D., Balakumar, C., Rao, K.V., Kaur, R., Rao, A.R., Murthy, J.N., Ravikumar, M.*, 2012. Molecular Modeling Evaluation of Non-Steroidal Aromatase Inhibitors. Chem. Biol. Drug Des. 79, 674–682. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01277.x

42. OECD, 2014. Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models, OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264085442-en

43. *Papa, E., Kovarich, S., Gramatica, P.*, 2013. QSAR prediction of the competitive interaction of emerging halogenated pollutants with human transthyretin£. SAR QSAR Environ. Res. 24, 333–349. https://doi.org/10.1080/1062936X.2013.773374

44. *Papa, E., Kovarich, S., Gramatica, P.*, 2010. QSAR Modeling and Prediction of the Endocrine-Disrupting Potencies of Brominated Flame Retardants. Chem. Res. Toxicol. 23, 946–954. https://doi.org/10.1021/tx1000392

45. *Porta, N., Roncaglioni, A., Marzo, M., Benfenati, E.*, 2016. QSAR Methods to Screen Endocrine Disruptors. Nucl. Recept. Res. 3. https://doi.org/10.11131/2016/101203

46. *Prachayasittikul, V., Pingaew, R., Worachartcheewan, A., Sitthimonchai, S., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V.*, 2017. Aromatase inhibitory activity of 1,4-naphthoquinone derivatives and QSAR study. EXCLI J. 16, 714–726. https://doi.org/10.17179/excli2017-309

47. *Rogers, D.*, 1999. Genetic Function Approximation: Evolutionary Construction of Novel, Interpretable, Nonlinear Models of Experimental Data, in: Truhlar, D.G., Howe, W.J., Hopfinger, A.J., Blaney, J., Dammkoehler, R.A. (Eds.), Rational Drug Design. Springer New York, New York, NY, pp. 163–189. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1480-9_13

48. *Roy, P.P., Roy, K.*, 2010. Docking and 3D-QSAR studies of diverse classes of human aromatase (CYP19) inhibitors. J. Mol. Model. 16, 1597–1616. https://doi.org/10.1007/s00894-010-0667-y

49. *Ruiz, P., Sack, A., Wampole, M., Bobst, S., Vracko, M.*, 2017. Integration of in silico methods and computational systems biology to explore endocrine-disrupting chemical binding with nuclear hormone receptors. Chemosphere 178, 99–109. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.026

50. *Sahoo, S., Adhikari, C., Kuanar, M., Mishra, B.K.*, 2016. A Short Review of the Generation of Molecular Descriptors and Their Applications in Quantitative Structure Property/Activity Relationships. Curr. Comput. Aided. Drug Des. 12, 181–205. https://doi.org/10.2174/1573409912666160525112114

51. *Schug, T.T., Johnson, A.F., Birnbaum, L.S., Colborn, T., Guillette, L.J., Crews, D.P., Collins, T., Soto, A.M., Vom Saal, F.S., McLachlan, J.A., Sonnenschein, C., Heindel, J.J.*, 2016. Minireview: Endocrine disruptors: Past lessons and future directions. Mol. Endocrinol. 30, 833–847. https://doi.org/10.1210/me.2016-1096

52. *Shoombuatong, W., Prachayasittikul, V., Prachayasittiku, V., Nantasenamat, C.*, 2015. Prediction of aromatase inhibitory activity using the efficient linear method (ELM). EXCLI J. 14, 452–464. https://doi.org/10.17179/excli2015-140

53. *Shoombuatong, W., Schaduangrat, N., Nantasenamat, C.*, 2018. Towards understanding aromatase inhibitory activity via QSAR modeling. EXCLI J. 17, 688–708. https://doi.org/10.17179/excli2018-1417

54. *Soto, A.M., Rubin, B.S., Sonnenschein, C.*, 2009. Interpreting endocrine disruption from an integrative biology perspective. Mol. Cell. Endocrinol. 304, 3–7. https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.020

55. *Suresh, N.*, 2013. Human Androgen Receptor Inhibitors: Computational 3D QSAR Studies to Design Lead Compounds for Treatment of Prostate Cancer. Turkish J. Biochem. 38, 262–279. https://doi.org/10.5505/tjb.2013.38258

56. *Tata, J.R.*, 2017. How Hormones, as Ancient Signalling Molecules, Regulate Diverse Biological Processes Through Evolution BT - Hormones in Ageing and Longevity, in: Rattan, S., Sharma, R. (Eds.), . Springer International Publishing, Cham, pp. 3–20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63001-4_1

57. *Thomas Zoeller, R., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J., Vom Saal, F.S.*, 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society. Endocrinology 153, 4097–4110. https://doi.org/10.1210/en.2012-1422

58. *Todeschini, R., Consonni, V.*, 2009. Molecular Descriptors for Chemoinformatics. WILEY-VCH.

59. *Todeschini, R., Consonni, V.*, 2000. Handbook of Molecular Descriptors, 1st ed. WILEY-VCH, Weinheim. https://doi.org/10.1002/9783527613106

60. *Tourneix, F., Alépée, N., Detroyer, A., Eilstein, J., Ez-Zoubir, M., Teissier, S.M., Noçairi, H., Piroird, C., Basketter, D., Del Bufalo, A.*, 2020. Skin sensitisation testing in practice: Applying a stacking meta model to cosmetic ingredients. Toxicol. Vitr. 66, 104831. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104831

61. *Trisciuzzi, D., Alberga, D., Mansouri, K., Judson, R., Novellino, E., Mangiatordi, G.F., Nicolotti, O.*, 2017. Predictive Structure-Based Toxicology Approaches to Assess the Androgenic Potential of Chemicals. J. Chem. Inf. Model. 57, 2874–2884. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00420

62. *Tropsha, A.*, 2010. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. Mol. Inform. 29, 476–488. https://doi.org/10.1002/minf.201000061

63. *Tropsha, A., Gramatica, P., Gombar, V.K.*, 2003. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. QSAR Comb. Sci. 22, 69–77. https://doi.org/10.1002/qsar.200390007

64. *Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.H., Myers, J.P., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W. V., Zoeller, R.T.,* 2013. Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. Reprod. Toxicol. 38, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.02.002

65. *Vinggaard, A.M., Niemela, J., Wedebye, E.B., Jensen, G.E.,* 2008. Screening of 397 chemicals and development of a quantitative structure--activity relationship model for androgen receptor antagonism. Chem. Res. Toxicol. 21, 813–823. https://doi.org/10.1021/tx7002382

66. *Vuorinen, A., Odermatt, A., Schuster, D.,* 2015. Reprint of "in silico methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals." J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 153, 93–101. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.08.015

67. *Waller, C.L., Juma, B.W., Earl Gray, L., Kelce, W.R.,* 1996. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships for androgen receptor ligands. Toxicol. Appl. Pharmacol. 137, 219–227. https://doi.org/10.1006/taap.1996.0075

68. *Wang, Y., Han, R., Zhang, H., Liu, Hongli, Li, J., Liu, Huanxiang, Gramatica, P.,* 2017. Combined Ligand/Structure-Based Virtual Screening and Molecular Dynamics Simulations of Steroidal Androgen Receptor Antagonists. Biomed Res. Int. 2017. https://doi.org/10.1155/2017/3572394

69. *Weiss, J.M., Andersson, P.L., Lamoree, M.H., Leonards, P.E.G., Van Leeuwen, S.P.J., Hamers, T.,* 2009. Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. Toxicol. Sci. 109, 206–216. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp055

70. WHO/UNEP, 2013. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO, World Health Organization.

71. WHO, 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors., WHO publication no. WHO/PCS/EDC/02.2.

72. *Worachartcheewan, A., Mandi, P., Prachayasittikul, V., Toropova, A.P., Toropov, A.A., Nantasenamat, C*., 2014a. Large-scale QSAR study of aromatase inhibitors using SMILES-based descriptors. Chemom. Intell. Lab. Syst. 138, 120–126. https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.07.017

73. *Worachartcheewan, A., Suvannang, N., Prachayasittikul, S., Prachayasittikul, V., Nantasenamat, C.*, 2014b. Probing the origins of aromatase inhibitory activity of disubstituted coumarins via qsar and molecular docking. EXCLI J. 13, 1259–1274. https://doi.org/10.17877/DE290R-7420

74. *Wu, Y., Doering, J.A., Ma, Z., Tang, S., Liu, H., Zhang, X., Wang, X., Yu, H.,* 2016. Identification of androgen receptor antagonists: In vitro investigation and classification methodology for flavonoid. Chemosphere 158, 72–79. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.059

75. *Wu, Y., Shi, W., Xia, P., Zhang, X., Yu, H., 2*017. Qualitative and quantitative simulation of androgen receptor antagonists: A case study of polybrominated diphenyl ethers. Sci. Total Environ. 603–604, 495–501. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.106

76. *Xie, H., Qiu, K., Xie, X.,* 2015. Pharmacophore modeling, virtual screening, and 3D-QSAR studies on a series of non-steroidal aromatase inhibitors. Med. Chem. Res. 24, 1901–1915. https://doi.org/10.1007/s00044-014-1257-9

77. *Xie, H., Qiu, K., Xie, X.*, 2014. 3D QSAR studies, pharmacophore modeling and virtual screening on a series of steroidal aromatase inhibitors. Int. J. Mol. Sci. 15, 20927–20947. https://doi.org/10.3390/ijms151120927

78. *Yang, W., Shen, S., Mu, L., Yu, H.,* 2011. Structure-activity relationship study on the binding of PBDEs with thyroxine transport proteins. Environ. Toxicol. Chem. 30, 2431–2439. https://doi.org/10.1002/etc.645

79. *Yang, X., Liu, H., Yang, Q., Liu, J., Chen, J., Shi, L.*, 2016. Predicting anti-androgenic activity of bisphenols using molecular docking and quantitative structure-activity relationships. Chemosphere 163, 373–381. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.062

80. *Yang, X., Lyakurwa, F., Xie, H., Chen, J., Li, X., Qiao, X., Cai, X.*, 2017. Different binding mechanisms of neutral and anionic poly-/perfluorinated chemicals to human transthyretin revealed by In silico models. Chemosphere 182, 574–583. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.016

81. *Yang, X., Xie, H., Chen, J., Li, X.*, 2013. Anionic phenolic compounds bind stronger with transthyretin than their neutral forms: Nonnegligible mechanisms in virtual screening of endocrine disrupting chemicals. Chem. Res. Toxicol. 26, 1340–1347. https://doi.org/10.1021/tx4001557

82. *Yen, P.M.*, 2001. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. Physiol. Rev. 81, 1097–1142. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1097

83. *Yilmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S., Kelestimur, F.*, 2020. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. Rev. Endocr. Metab. Disord. 21, 127–147. https://doi.org/10.1007/s11154-019-09521-z

84. *Zhang, J., Kamstra, J.H., Ghorbanzadeh, M., Weiss, J.M., Hamers, T., Andersson, P.L.*, 2015. In Silico Approach To Identify Potential Thyroid Hormone Disruptors among Currently Known Dust Contaminants and Their Metabolites. Environ. Sci. Technol. 49, 10099–10107. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01742

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGIA

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Los manuscritos, **en español o inglés**, se someterán por el editor a dos expertos que actuarán como revisores externos a la revista, cuyas observaciones se trasladarán al autor para la reescritura del original en caso de ser aceptados.

El texto debe ser claro y conciso, cuidando la ortografía y la utilización de abreviaturas (SI). Tanto la forma como el contenido deberán ser cuidadosamente revisados antes de su envío. Se utilizará **interlineado a doble espacio, letra tipo Times New Roman de 12 puntos, sin sangrías en los párrafos, con justificación completa**, con márgenes amplios, en tamaño DIN A4, preferiblemente en archivo Word. Todas las páginas irán numeradas correlativamente.

Manuscritos en **español**: Título, Apellido/s e inicial/es del nombre del autor/es, Institución/es, Resumen, Palabras Clave, Title, Abstract, Key Words, Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Bibliografía, Tablas, Leyendas de las Figuras.

Manuscritos en **inglés**: Title, Family name/s and First name/s initial/s, Abstract, Key Words, Título, Resumen, Palabras Clave, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Leyends of figures.

El manuscrito se estructura, por tanto, en los siguientes apartados (por favor, no use mayúsculas más que en la primera letra del título y apartados):

Título descriptivo del artículo (no en mayúsculas) y **Title**, además de una versión corta del título.

Apellido/s e inicial/es del nombre del autor/es.

Institución/es donde se ha realizado el trabajo, distinguiéndolas con numerales en superíndice. Marcar con un asterisco el autor de contacto e incluir su correo electrónico, teléfono y fax.

Resumen y Abstract. Las versiones en español e inglés serán lo más informativas posible, en un solo párrafo, con una pequeña introducción, la identificación de los métodos, los resultados abreviados y particularmente las conclusiones del trabajo. Su lectura dará una idea clara del mismo. Ninguno debe sobrepasar las **250** palabras ni incluir abreviaturas, referencias o tablas.

Palabras Clave y Key Words tras cada resumen, con hasta cinco palabras separadas por punto y coma.

Introducción: descripción de los orígenes y bases del estudio.

Material y Métodos. Se evitarán descripciones de todo aquello que pueda encontrarse en la bibliografía citada. Deben describirse de forma concisa los individuos y series estudiados, criterios de selección, procedimientos, duración y número de repeticiones de los ensayos, equipo y materiales utilizados y cuantos datos puedan precisarse para la repetición del estudio. Deben especificarse las técnicas analíticas y los métodos estadísticos. Para sustancias químicas o fármacos se citará el nombre genérico conforme a la IUPAC. Si se utiliza una marca registrada, se hará constar el nombre genérico y el nombre del fabricante.

Resultados. Se presentarán las observaciones realizadas, sin interpretarlas, así como el análisis estadístico. Los datos numéricos se pueden presentar en tablas o figuras, pero sin repetirlos entonces en el texto.

Discusión: en ella se considerarán los resultados presentados comparándolos con otros publicados, las razones que apoyan la validez de los mismos, su aplicación práctica y las directrices para nuevas investigaciones.

**Los apartados de resultados y discusión pueden redactarse conjuntamente.*

Conclusiones. Breves obtenidas directamente del trabajo.

Agradecimientos. Si fueran necesarios, particularmente a las entidades financiadoras.

Bibliografía. La exactitud de las referencias bibliográficas es responsabilidad de los autores. Sólo deberían incluirse referencias relacionadas estrechamente con el trabajo. Todas las referencias listadas deben ir citadas en el texto.

Las referencias bibiográficas se referencian en el texto con el apellido del autor y año de publicación si el autor de la obra es uno solo (Font, 2005). En caso de ser dos los autores de la publicación se citarán los apellidos de ambos (Font y Ruiz, 2009). Si son tres o más los autores se pondrá el apellido del primer autor et al., año (Tolosa et al., 2013). Las referencias a distintos trabajos en una misma cita se separan con punto y coma y son ordenadas cronológicamente: (Rodriguez et al., 2012; Serrano et al., 2013). Si existieran varias referencias de un autor/es o autora/s en un mismo año se consignarán con las letras a, b, c, etc., después del año.

En el apartado de bibliografía se recogen todas las referencias por orden alfabético y del modo indicado a continuación. La bibliografía irá citada de la siguiente forma:

1. Artículos de revistas.-

Estructura general: Autor/es. Título del artículo. Abreviatura internacional de la revista. Año; volumen (número), página inicial-final del artículo.

Ejemplo: *Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E*. Presencia de micotoxinas Fusarium en pescado de acuicultura. Rev. Toxicol. 2013; 30 (2), 193-197.

2. Libros y otras monografías.-

Estructura general: Autor/es.Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. La primera edición no es necesario consignarla. La edición siempre se pone en números arábigos y abreviatura: 2ª ed. Si la obra estuviera compuesta por más de un volumen, debemos citarlo a continuación del título del libro: Vol. 3.

-Capítulo de libro.

Autor/es del capítulo. Título del capítulo. En: Director/Coordinador/Editor del libro. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. Página inicial-final del capítulo.

Ejemplo: Cameán AM, Repetto M. Introducción y conceptos. En Cameán AM, Repetto, M. (Eds.), Toxicología alimentaria. Díaz De Santos, Madrid, España. 2006. p.1-18.

-Comunicación presentada a un congreso.

Autor/es de la Comunicación/Ponencia. Título de la Comunicación/Ponencia. Título oficial del Congreso. Publicación. Editorial; año. Página inicial-final de la comunicación/ponencia.

Ejemplo: Saladino, F., López, M., Manyes, L., Fernández-Franzón, M., Meca, G. El uso de antimicrobianos naturales para el aumento de la vida útil del pan de molde. XXICongreso Español y V Iberoamericano de Toxicología. Rev. Toxicol. 32 (1). Asociación Española de Toxicología; 2015, p32.

3. Material electrónico.- Artículo de revista en Internet.

Autor/es del artículo. Título del artículo. Nombre de la revista [revista en Internet] año [fecha de consulta]; volumen (número): [Extensión/páginas]. Dirección electrónica.

Ejemplo: Francés I, Barandiarán M, Marcellán T, Moreno L. Estimulación psicocognoscitiva en las demencias. An Sist Sanit Navar [revista en Internet] 2003 septiembre-diciembre. [Acceso 19 de octubre de 2005]; 26(3). Disponible en: http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol26/n3/revis2a.html

-Monografía en Internet.

Autor/es o Director/Coordinador/Editor. Título [monografía en Internet]. Edición. Lugar de publicación: Editor; año [fecha de consulta]. Dirección electrónica.

Ejemplo: Moraga Llop FA. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Dermatología Pediátrica. [Monografía en Internet]. Madrid: Asociación

Española de Pediatría; 2003 [acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: http://www.aeped.es/protocolos/dermatologia/index.htm

Autor/es. Título [sede Web]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [fecha de actualización; fecha de acceso]. Dirección electrónica.

Ejemplo: Fisterra.com, Atención Primaria en la Red [sede Web]. La Coruña: Fisterra.com; 1990- [actualizada el 3 de enero de 2006; acceso 12 de enero de 2006]. Disponible en: http://www.fisterra.com

-Parte de una página de un sitio o sede Web.

Título de la página [sede Web]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [fecha de actualización/revisión; fecha de acceso]. Título de la sección [número de páginas o pantallas]. Dirección electrónica.

Ejemplo: American Medical Association [sede Web]. Chicago: The Association; c1995- 2002 [actualizado 5 de diciembre de 2005; acceso 19 de diciembre de 2005]. AMA Office of Group Practice Liaison; [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html.

–Base de datos en Internet.

Institución/Autor. Título [base de datos en Internet]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de creación, [fecha de actualización; fecha de consulta]. Dirección electrónica.

Ejemplo: PubMed [base de datos en Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 1966- [fecha de acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/

-Parte de una base de datos en Internet. MeSH Browser [base de datos en Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 [acceso 19 de diciembre de 2005]. Meta-analysis; unique ID D015201 [aproximadamente 3 pantallas]. Disponible en: http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html. Ficheros actualizados semanalmente.

Para otras situaciones no recogidas en este texto se puede consultar la siguiente dirección
http://www.fisterra.com/herramientas/recursos/vancouver/#ejemplos

Tablas

- Deben ser tan claras y simples como sea posible.
- Las tablas se incluyen **tras la bibliografía**, en el documento principal del manuscrito, en páginas independientes, numeradas correlativamente (1, 2…).
- Los títulos deben ser suficientemente descriptivos para hacerlos comprensibles sin consultar el texto.
- La información adicional puede incluirse como nota al pie de tabla o figura.
- Las tablas debieran ser lo suficientemente cortas para evitar dividirlas.

-Sede Web o Página principal de inicio de un sitio Web.

Figuras

Los pies de las figuras se incluyen en el documento principal del manuscrito, tras las tablas, numerados consecutivamente (1, 2…) y deben ser lo suficientemente descriptivos como para hacerlos comprensibles sin necesidad de consultar el texto.

Las figuras propiamente dichas se envían **comprimidas en formato WinZip**. Las imágenes se enviarán digitalizadas, preferiblemente en formato TIFF, JPEG o PNG de al menos 300 p.p.p.de resolución (pero no mucho más) para el tamaño final.

Dado que actualmente la revista únicamente se edita en versión digital, las figuras deberán enviarse en color. Los símbolos identificadores preferidos en las figuras son círculo, cuadrado y triángulo abiertos o llenos.

Las figuras deben tener suficiente calidad. **No contendrán los títulos ni referencia a su número ni tendrán innecesariamente espacio en blanco alrededor**.

Las señales y leyendas se pueden incluir dentro de los ejes de la figura.

Las figuras publicadas previamente deben contar con el permiso escrito del titular de los derechos.

La redacción de la revista se reserva el derecho de introducir modificaciones en los artículos recibidos, siempre que no alteren el sentido de los mismos, para adaptarlos al estilo de la revista.

Los trabajos se enviarán a través de la plataforma de la revista: **http://rev.aetox.es/wp/index.php/envio-articulo/**

El Equipo Editorial: revista@aetox.es

Directora:
Dra. Guillermina Font Pérez. Universitat de València.
Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal.
Avda. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Valencia

Subdirectora:
Dra. Emilia Ferrer García. Universitat de València

Editores asociados:

Dra. María P. Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura

Dr. Juan Carlos Rios Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 37 (1), 1-68 (2020)
ISSN 0212-7113

Calidad de Revistas Científicas Españolas FECYT | FUNDACIÓN ESPAÑOLA PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA | 2016

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/Excerpta Medica y Chemical Abstracts

Asociación Española de Toxicología

Presidenta: Dra. Ana Cameán Fernández
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

Vicepresidenta: Dra. Mª José Ruiz Leal
Facultat de Farmàcia. Universitat de València.

Secretaria: Dra. Emma Martínez López.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Tesorera: Dra. Ángeles Jos Gallego.
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Internet: http://aetox.es

Sección de Educación en Toxicología

Dra. Mónica Fernández Franzón
Universitat de València. Valencia

Sección de Toxicología Clínica

Dra. Ana Isabel Morales Martín
Universidad de Salamanca. Salamanca

Sección de Métodos Alternativos

Dr. Rafael Balaña Fouce
Universidad de León. Leon

Sección de Toxicología Experimental

Dra. Rosario Moyano Salvago
Universidad de Córdoba. Córdoba

Sección de Seguridad Alimentaria

Dra. Silvia Pichardo Sánchez
Universidad de Sevilla. Sevilla

Sección de Toxicología Forense

Dra. Ana Maria Bermejo Barrera
Universidad de Santiago de Compostela. La Coruña

Sección de Toxicología Ambiental

Dr. Fernando Gil Hernández
Universidad de Granada. Granada

Sección de Toxicología Veterinaria

Dr. Francisco Soler Rodríguez
Universidad de Extremadura. Cáceres

Revista de Toxicología (Editada desde 1983)

Directora:
Dra. Guillermina Font Pérez.
Universitat de València. Valencia

E-mail equipo Editorial: revista@aetox.es

Subdirectora:
Dra. Emilia Ferrer García.
Universitat de València. Valencia

Editores adjuntos:
Dra. María P. Míguez Santiyán.
Universidad de Extremadura. Cáceres

Dr. Juan Carlos Rios Bustamante
Pontificia Universidad Católica de Chile