

Evaluación del daño oxidativo inducido por fluoroquinolonas bajo un modelo *in vivo*

Díaz Pineda K.¹, Péz Yaruro M.¹, Márquez Lázaro J.¹, Méndez Cuadro D.¹, Rodríguez Cavallo E.¹

¹Grupo de Investigación en Química Analítica y Biomedicina – Universidad de Cartagena, Sede Zaragocilla, Antiguo Edificio CREAD – Laboratorio 103. Cartagena de Indias - Colombia

Correo: erodriguezc1@unicartagena.edu.co

Palabras Clave: ciprofloxacina, danofloxacina, Límite Máximo de Residuos, *Eisenia foetida*

Introducción

La necesidad de mantener el bienestar animal bajo los sistemas de cría intensiva ha dado paso al empleo de antimicrobianos y biocidas como los plaguicidas [1]. Su empleo con cualquiera de las finalidades autorizadas para dichas sustancias, conlleva la presencia de sus residuos en el tejido animal, colocando en riesgo al consumidor frecuente del alimento [2]. Así, la necesidad de garantizar un alimento inocuo llevó a los organismos mundiales, encargados de la regulación del comercio alimentario, a establecer el límite máximo de residuo (LMR), concentración admisible para que un contaminante pueda estar presente en un alimento sin representar un riesgo para la salud humana [3]. No obstante, debido a que muchas de las sustancias de origen veterinario poseen capacidad para formar especies reactivas de oxígeno (EROs) [4], surge la inquietud sobre la inocuidad atribuida al LMR sobre macromoléculas importantes en la cadena alimentaria, como las proteínas, ya que a dicho nivel estas sustancias podrían inducir daños oxidativos irreversibles sobre éstas. Los daños oxidativos han llegado a asociarse con procesos de envejecimiento y la incidencia cada vez mayor de enfermedades crónicas muy ligadas al desequilibrio entre los fenómenos de oxidación y reducción del cuerpo humano.

Estudios previos, realizados en nuestro grupo de investigación y basados en el empleo de metodologías *in vitro*, nos permitieron evaluar tal efecto, confirmando el potencial de las fluoroquinolonas Ciprofloxacina y Danofloxacina para inducir daño oxidativo sobre proteínas del músculo bovino. Considerando las implicaciones bioéticas de una investigación basada en el empleo de un modelo *in vivo*, y con el fin de ampliar los hallazgos obtenidos, se evaluó el potencial de concentraciones en torno al LMR de estas sustancias para inducir daño oxidativo sobre el anélido *Eisenia foetida* [5].

Metodología

Para evaluar el efecto de la exposición a tres niveles de concentración (0.5, 1 y 1.5 veces el LMR) de dos contaminantes alimentarios: las fluoroquinolonas Ciprofloxacina y Danofloxacina, inicialmente, se estandarizó el ciclo de vida del modelo biológico empleado, bajo condiciones de laboratorio. Para ello, se evaluó la viabilidad de tierra proveniente de zonas no influenciadas por actividades agropecuarias, para su empleo como sustrato en la realización de los ensayos. A la tierra limpia, seca y removida, se le midieron parámetros físico-químicos como pH, humedad, contenido de carbono y capacidad de retención de agua (n=3), importantes de acuerdo con la guía 207 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico para establecer su idoneidad como sustrato [6].

La determinación del contenido de carbono se realizó siguiendo el método de Walkley-Black [7]. Para ello, a 1g de tierra, seca se adicionaron secuencialmente, 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1N, 20 mL de H_2SO_4 , calentándola posteriormente a 135°C. Cuando la mezcla alcanzó la temperatura ambiente, se tituló el exceso de $K_2Cr_2O_7$ empleando como agente valorante una solución de $FeSO_4$ 0,4N acidificada con 1,5 mL de H_2SO_4 , y utilizando ferroína como indicador. El punto final de la titulación se determinó cuando la solución viró de color naranja a gris-verdoso.

Finalmente, la capacidad de retención de agua se determinó de acuerdo con el método establecido en la “Guía para el ensayo de productos químicos” [8]. Brevemente, 5g de tierra (n=5), se sometieron a calentamiento a 150 °C hasta alcanzar un peso constante de tierra. Este criterio se cumplió luego de 15 minutos de calentamiento, empleándose 5 réplicas en su determinación. Las lombrices se aclimataron por una semana previo a su uso. Posteriormente se expusieron a los contaminantes mencionados, ensayando tres niveles de concentración, en función del LMR admitido para tejido animal por los organismos regulatorios para cada fluoroquinolona. Los experimentos se monitorizaron durante 28 días, realizando

dos réplicas por nivel de contaminante, y contrastando frente a controles de lombrices no expuestas. Al finalizar los ensayos se determinó la pérdida de peso inducida sobre el modelo y el daño oxidativo medido como índice de carbonilo causado en las proteínas del músculo de la lombriz. Para ello se emplearon metodologías basadas en electroforesis y Dot blot. Los perfiles electroforéticos obtenidos y las membranas transferidas se digitalizaron en un fotodocumentador ChemiDoc.

Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Para la comparación de las medias entre el blanco y los tratamientos se empleó ANOVA de una vía con post-test de Tukey's. El paquete estadístico usado fue GraphPad Prism versión 5.01.

Resultados y discusión

Los resultados mostraron que todos los contaminantes, a cualquiera de los niveles de exposición, indujeron pérdidas de peso y daño oxidativo en las proteínas aisladas del músculo (Figura 1). En la mayoría de los casos evaluados, estos fueron significativamente mayores que lo observado en los controles ($p < 0.05$), siendo el mayor promotor de oxidación ciprofloxacina seguido de danofloxacina.

La carbonilación presentó un comportamiento dependiente de la concentración en ambos contaminantes. Por medio del análisis del densitograma, se realizó una semi-cuantificación de las bandas oxidadas y se determinó que las bandas de los tratamientos estaban mayormente oxidadas respecto a las bandas de los blancos confirmando los resultados obtenidos en los ensayos por Dot blot.

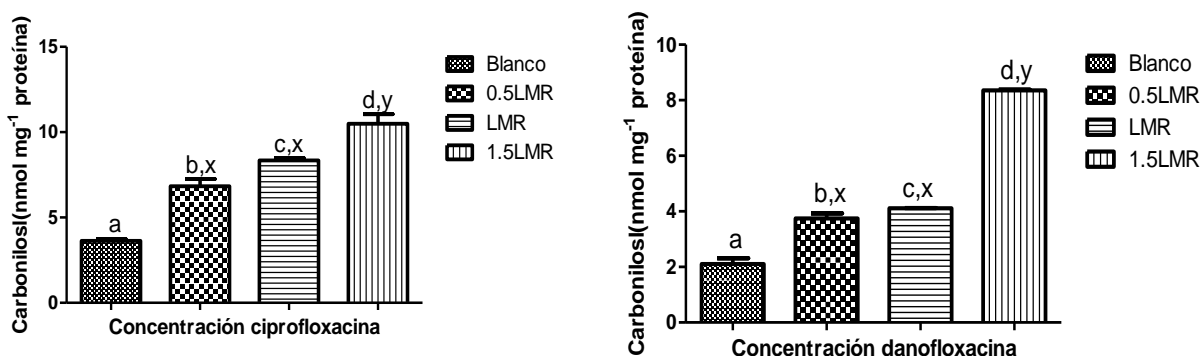


Figura 1. Análisis de la carbonilación determinada tras la exposición a Ciprofloxacina y Danofloxacina. El valor calculado se muestra como resultado de la media \pm desviación estándar ($n=2$). B: blanco. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto: al blanco (a-d) y respecto a los IC inducido por las concentraciones del contaminante (x-y).

Conclusiones

Las fluoroquinolonas ciprofloxacina y danofloxacina, promueven significativamente, pérdida de peso y daño oxidativo en las proteínas del músculo de la lombriz *Eisenia foetida*, tras su exposición a los niveles 0.5, 1 y 1.5LMR en cada contaminante.

Los daños oxidativos y la repercusión sobre el desarrollo de las lombrices se presentan a niveles 0.5 y 1LMR en los contaminantes evaluados, valores considerados inocuos por los organismos regulatorios del comercio alimentario para su presencia en el tejido animal.

La especie *E. foetida* constituye un modelo biológico adecuado para medir estrés oxidativo causado por contaminantes ambientales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias y la Universidad de Cartagena por el apoyo financiero a los proyectos 1107-711-50102 y Acta de Compromiso 088-2018. Johana Márquez Lázaro agradece a Colciencias por la Beca Doctoral 647-2014.

Referencias

- 1.OIE. (2015). Criterios usados para la clasificación. Lista de los agentes antimicrobianos. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria, 33(0): 1–9.
- 2.Suárez Olivares, A. T., & Vera Vidal, V. (2011). Uso y abuso del ciprofloxacino. *Medisan*, 15(3): 384–392.
- 3.Europea, C. (2010). Reglamentos UE N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009. Diario Oficial de La Unión Europea.
- 4.V. Talla and P.R. Veerareddy. (2011). Oxidative Stress Induced by Fluoroquinolones on Treatment for Complicated Urinary Tract Infections in Indian Patients, *J Young Pharm.* 3(4): 304–309.
- 5.Dasong L., Qixing Z., Yingming X., Chun C. and Ye L., (2012). Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination, *Environmental Pollution* 171: 46-51.
- 6.Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. Earthworm, acute toxicity tests. Guideline for testing of chemicals N° 207 (adoptado en abril de 1984). OCDE, París, 9 pp
- 7.Gelman, F., Binstock, R., & Halicz, L. (2012). Application of the Walkley-Black titration for the organic carbon quantification in organic rich sedimentary rocks. *Fuel*, 96: 608–610. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.12.053>
- 8.OECD. (2015). Guideline for the testing of chemicals-207, (June). Disponible en: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG%20412%20Revised%2016-OCT-2015.pdf>. Ultimo acceso: 15 de abril de 2019.