

**Formato de presentación de proyectos para ser sometidos ante el Comité de ética
Institucional de Investigación.**

Título: Estudio *in vitro* de la alteración de eritrocitos humanos por pesticidas de uso extendido y moléculas macrocíclicas.

Nombres y apellidos de los investigadores

Investigador principal: Obradith Caicedo Orjuela. Docente investigadora U. Santo Tomás.

<https://orcid.org/0000-0002-3767-0636>

Co-investigador 1: Edwin Andres Malagón Bernal. Docente investigador U. Antonio Nariño

<https://orcid.org/0000-0003-0118-1491>

Co-investigador 2: Yuly Bernal. Docente U. Antonio Nariño

<https://orcid.org/0000-0003-3145-8789>

Tipo de proyecto: FODEIN

Resumen

La agricultura intensiva ha llevado al uso indiscriminado de pesticidas en las últimas décadas afectando los ecosistemas y en última instancia al ser humano. Muchos de ellos están involucrados en el desarrollo de enfermedades que afectan significativamente la salud. En trabajos anteriores, los investigadores del presente proyecto han estudiado la influencia de resorcinarenos (moléculas macrocíclicas) y su efecto en la actividad de enzimas como la catalasa, encontrando cambios conformacionales que llevaron a disminuir la actividad de la enzima significativamente. Con este trabajo se pretende a nivel *in vitro* estudiar el efecto que pueda tener la interacción entre resorcinarenos y pesticidas comunes como nicotina, glifosato y ácido amino metil fosfónico (AMPA) sobre la integridad de eritrocitos humanos. Para esto, los eritrocitos serán sometidos a contacto con estas moléculas (incubación) y se realizarán medidas de actividad catalasa, oxidación de proteínas, actividad antioxidante, estabilidad del grupo prostético e integridad a través de microscopía. Con los resultados se pretende contribuir al conocimiento del impacto de este tipo de moléculas sobre la salud del ser humano y el potencial de los resorcinarenos como moléculas coadyuvantes o sinérgicas en la interacción con los pesticidas.

Palabras clave

Nicotina, glifosato, AMPA, resorcinarenos, eritrocitos.

Introducción

Se han reportado estudios para la biodegradabilidad de glifosato y sus metabolitos en suelo con microorganismos (Zhan et al., 2018). Por otra parte, el uso de quercetina se ha estudiado con el fin de evaluar su efecto en la protección de daños oxidativos a nivel celular frente a la nicotina (Yarahmadi et al., 2017). Sin embargo, no hay reportes de estudios de moléculas sintéticas que puedan interactuar con estos pesticidas y que puedan llegar a constituirse en posibilidades para la mitigación de su impacto sobre ecosistemas y el ser humano. El uso de aditivos sintéticos presenta potencial, tanto para inhibir como para potenciar los efectos de plaguicidas.

Las moléculas sintéticas que se proponen son resorcinarenos sulfonados, que han sido previamente estudiados en la interacción con el amiloide abeta (Han Park, et al. 2017) y la insulina (Han Tian, et. al. 2017), donde se reveló una interacción que conduce la inhibición de la fibrilación de ambas proteínas. Además, solamente el estudio con abeta incluyó un indicio acerca de la inocuidad de los resorcinarenos frente a embriones de erizo de mar. Previamente, nuestro grupo de investigación (asociado a la U. Antonio Nariño) estudió el efecto de cinco resorcinarenos sobre catalasa, una enzima que controla el estrés oxidativo. En dicho estudio (Resultados en proceso de publicación) se encontró una inhibición de tipo no-competitivo que va desde 10-70 %.

Las moléculas de tipo resorcinareno han sido estudiadas por su capacidad de formar uniones supramoleculares con gran variedad de moléculas, conocidas como “huéspedes”. Esto debido a dos factores: presentan forma de “cono” en donde pueden alojarse los huéspedes, y presentan una gran variedad de posibilidades de interacción (puentes de hidrógeno, van der Waals, etc.). Se ha experimentado no solo con proteínas, sino con otras moléculas como huéspedes: aminoácidos, medicamentos, y otras sustancias biológicamente relevantes (Sanabria y Maldonado, 2019).

Con base en esas investigaciones, es interesante el estudio de la actividad de la catalasa, ya no sobre la proteína purificada, sino a nivel celular. Donde el target de elección son los eritrocitos humanos, células que presentan la mayor actividad en cuanto a especies reactivas

de oxígeno. Adicionalmente, pueden ser usadas moléculas de interés en agricultura como huéspedes en interacciones de competencia. De tal manera que se han escogido: glifosato, AMPA y nicotina. Esto permite tener un panorama *in vitro* de las interacciones entre moléculas a nivel biológico.

Planteamiento del problema y pregunta de investigación.

El uso de pesticidas para el control de plagas, el manejo de malezas o cultivos ilícitos es un tema de gran complejidad dado que se hace necesario contar con un gran número de evidencias sobre sus efectos sobre el ecosistema y la salud humana para poder legislar al respecto. Aunque existen varios estudios que han revelado la afectación que muchos de estos generan sobre diferentes organismos a nivel *in vivo* e *in vitro*, son pocos los que proponen una alternativa para su remediación. Teniendo en cuenta lo anterior se plantea en este proyecto las siguientes preguntas de investigación:

¿La presencia de resorcinarenos puede tener un efecto sinérgico o inhibitorio sobre el mecanismo de interacción de los pesticidas en los eritrocitos humanos? , ¿el estudio de estas interacciones puede aportar al conocimiento de mecanismos de acción de los pesticidas sobre los eritrocitos?, ¿el conocimiento de estos mecanismos aportarían a procesos de remediación?

Justificación de la investigación.

La necesidad de lograr mayores volúmenes de producción de alimentos para satisfacer la demanda alimenticia ha llevado a cultivadores a incrementar significativamente el uso de pesticidas y plaguicidas sin tener en cuenta la afectación que estos puedan tener sobre los ecosistemas y la salud del ser humano. El glifosato y sus metabolito (AMPA) se ha usado para controlar malezas (Steinrticken y Amrhein, 1980) y en la erradicación de cultivos ilícitos. La nicotina por su parte es un alcaloide presente en hojas de tabaco usado como pesticida (Luttrell y Vogel, 2014). Estudios realizados metabolitos (Van Bruggen et al., 2018; Kwiatkowska et al., 2014; Kurenbach et al., 2015) han demostrado los efectos nocivos que tienen para el medio ambiente y la salud el glifosato, sus y la nicotina (Padmavathi et al., 2010; Sikdar et al., 2017). Esto resultados hacen necesario profundizar en los efectos y mecanismos de acción de estos pesticidas sobre la salud humana, así como alternativas para su tratamiento o remediación. Los resorcinarenos, son moléculas sintéticas que han demostrado la capacidad de interacción con distintos tipos de moléculas (Han, 2017), entre

las que se encuentran algunas de naturaleza proteica, por lo que son moléculas con potencial para interactuar con efecto sinérgico o inhibitor en procesos metabólicos como los que se llevan a cabo entre pesticidas y eritrocitos.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende estudiar la interacción entre Glifosato, AMPA y nicotina sobre la integridad y procesos metabólicos en eritrocitos humanos en presencia de resorcinarenos, y de esta manera contribuir al entendimiento de la afectación de estos pesticidas sobre la salud humana y el potencial de los resorcinarenos como moléculas sinérgicas o inhibitoras de dichos procesos.

Objetivos

Objetivo general

Establecer el papel de cinco resorcinarenos sulfonados sobre los efectos de nicotina, glifosato, AMPA en parámetros metabólicos e integridad de eritrocitos humanos

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad catalasa en eritrocitos ante la presencia de pesticidas.
2. Evaluar la actividad catalasa en eritrocitos ante la presencia de resorcinarenos sulfonados.
3. Establecer el efecto de resorcinarenos en presencia de los pesticidas sobre la actividad catalasa
4. Evaluar parámetros bioquímicos (oxidación de proteína, poder antioxidante, porcentaje de hemólisis, determinación de hemoglobina y liberación de hemo) resultantes de la interacción entre eritrocitos en presencia de plaguicidas y resorcinarenos
5. Observar la integridad de eritrocitos tratados con los pesticidas en presencia de resorcinarenos por microscopía.

Marco Teórico

Glifosato y AMPA

El glifosato [N-(fosfometil) glicina] es un herbicida de amplio espectro comúnmente usado para el control de malezas (fig. 1). Este, al ser absorbido por las hojas, se transporta a todas las partes de la planta causándole finalmente la muerte. Esto como consecuencia de la

inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) lo que genera acumulación de ácido Shiquimico y finalmente la interrupción de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos como triptófano, fenilalanina y tirosina, indispensables en otros procesos bioquímicos de la planta (Steinrticken y Amrhein, 1980).

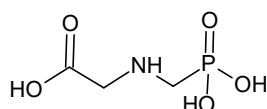
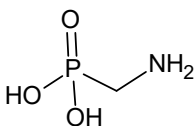


Figura 1. Molécula del N-(fosfonometil)glicina (Glifosato)

El AMPA, ácido aminometilfosfónico (fig. 2) es un producto de degradación de fosfonato, degradación microbiana de glifosato en suelo y de fotodegradación de amino-plofosfonatos en el agua.



➤ **Figura 2. Ácido aminometilfosfónico (AMPA)**

Esta molécula se caracteriza por ser muy estable debido a los fuertes enlaces carbono-fosforo, por tanto, su vida útil y acumulación en medios acuáticos, suelos, sedimentos, productos vegetales y órganos animales se ve favorecida (Grandcoin et al., 2017).

En 2015 La Organización Mundial de la Salud reclasificó al glifosato como probablemente carcinógeno para los humanos (Van Bruggen et al., 2018), y ya se han reportado estudios donde se evidencia cambios en los parámetros metabólicos de eritrocitos humanos como consecuencia del contacto con el glifosato y sus metabolitos (Kwiatkowska et al., 2014). Alteraciones significativas en procesos metabólicos y hematológicos en peces (De Moura et al., 2017), y se ha relacionado el uso de este herbicida con la resistencia a los antibióticos y agentes microbianos de importancia clínica en algunas bacterias (Kurenbach et al., 2015).

Nicotina

Con nombre 3-(1-metil-2-pirrolidin)piridina (fig. 3) es extraída de las hojas de *Nicotiana tabacum*. Es un líquido oleoso de color amarillo pálido, higroscópico. Se clasifica como un

alcaloide con potentes propiedades adictivas. Está presente en productos como el tabaco y sus extractos se han tenido diversos usos como pesticidas (Luttrell y Vogel, 2014), debido a su efecto neurotóxico sobre los insectos. Sin embargo, dada su alta toxicidad por ingestión accidental, inhalación o contacto con la piel ha sido prohibida en muchos países para fines agrícolas.

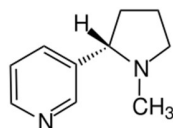


Figura 3. Nicotina

La nicotina se degrada principalmente en el hígado por procesos enzimáticos y su tiempo de vida media es de aproximadamente 2 horas generando cotinina (Alkam y Nabeshima, 2019). Debido a su alta solubilidad en agua, esta puede migrar a cuerpos de agua, por tanto, puede constituirse en un riesgo para el medio ambiente así como para la salud humana.

A nivel de estudios in vitro, existen reportes de daños en eritrocitos de fumadores por hemólisis, peroxidación lipídica, aumento en las especies reactivas de oxígeno entre otras afectaciones (Padmavathi et al., 2010), y alteraciones morfológicas (Sikdar et al., 2017).

Resorcinarenos

Los resorcinarenos (fig. 4) son macrociclos derivados del resorcinol que poseen una gran versatilidad en el reconocimiento de sustancias. Son poco solubles en agua. Estos compuestos tienen la facultad de formar una cavidad tridimensional en donde se menciona que pueden alojar diferentes iones o moléculas neutras, por medio de interacciones como puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, catión- grupos pi e hidrofóbicas (Han, 2017).

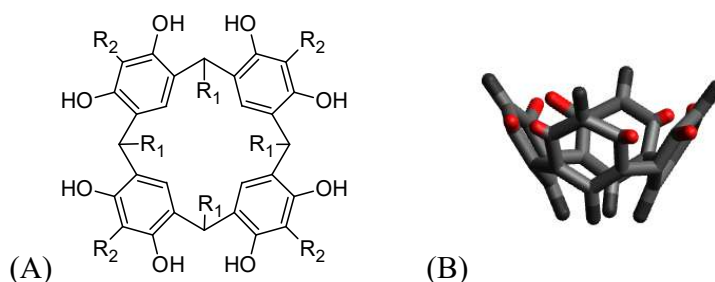


Figura 4. (A) Resorcinarenos propuestos en el presente estudio. Na₄MeRA R₁=-CH₃, R₂=CH₂SO₃Na; Na₄EtRA R₁=-CH₂CH₃, R₂= CH₂SO₃Na; Na₄PrRA R₁=- CH₂ CH₂CH₃, R₂= CH₂SO₃Na; Na₄SRA R₁=- CH₂ CH₂SCH₃, R₂= CH₂SO₃Na; Na₄ESRA R₁=- CH₂CH₂SO₃Na, R₂=H. Estructura típica en forma de copa de Resorcinareno **(B)**

La interacción de resorcinarenos con moléculas de naturaleza proteica como enzimas (catalasa y lipasa) y albúmina ya se ha estudiado por los autores de este proyecto, encontrándose un efecto inhibitorio de su actividad en el caso de catalasa y aumento de esta en lipasa. Por tanto, se convierten en moléculas con potencial para interactuar con efecto sinérgico o inhibidor en procesos metabólicos.

Eritrocitos

Los eritrocitos son células sanguíneas que se originan en la médula ósea. Carecen de estructuras internas de membrana, se pueden aislar fácilmente y como característica importante presentan cambios morfológicos, liberación extracelular de hemoglobina, aumento del contenido de adenosintrifosfato (ATP) cuando son expuestos a xenobióticos. Los eritrocitos son vulnerables a la peroxidación lipídica frente a la presencia de estas sustancias. Los cambios en la capacidad antioxidante de los glóbulos rojos son indicativo de la capacidad del xenobiótico para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que llevan al daño oxidativo los hacen un buen modelo para diferentes ensayos de citotoxicidad in vitro (Faraga y Alagawany, 2018).

Catalasa

La catalasa es una metaloenzima con un grupo hemo como cofactor. Presenta en su estructura cadenas de polipéptidos orientadas en forma de dímeros o tetrámeros con un núcleo de hierro. Cataliza la reacción donde el ion férrico del grupo hemo reduce el peróxido de hidrógeno para producir oxígeno y agua (Vlasits et al, 2010). Uno de los papeles más importante de esta enzima es en procesos antioxidantes a nivel celular, dado que está involucrada en mecanismo de defensa frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), razón por la que cuantificar la actividad de esta enzima es un indicador usado como marcador rápido, no invasivo para identificar diversas anomalías a nivel celular (Sepasi y Moosavi-Movahedi, 2018). Este criterio se ha aplicado con mucho éxito en otros campos como indicador en la identificación y seguimiento de exposición a polución química (Vasylykiv et al, 2011).

Las células de casi cualquier organismo están expuestas a ambientes oxidantes siendo el oxígeno la molécula del metabolismo aeróbico responsable de generar productos denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) con altísima habilidad para oxidar. Entre las ROS se encuentran: oxígeno molecular (O_2), ozono (O_3), oxígeno singulete (O_2^{\cdot}) anión

superóxido (O_2^*), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxido (OH_2^*) y radical hidroxilo (OH^*). Como sistema de defensa frente a estas especies reactivas los distintos organismos han desarrollado sistemas antioxidantes que pueden contrarrestarlos. Entre los sistemas antioxidantes se pueden encontrar macromoléculas que las ROS; enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, transferasa y catalasa; cosustratos antioxidantes y enzimas que los producen; antioxidantes endógenos y exógenos y sistemas de reparación. Una forma de evaluar el grado de afectación de una sustancia xenobiótica en una célula es determinar la capacidad antioxidante, este parámetro refleja el estado del sistema antioxidante ante un factor oxidativo en un sistema en particular. Su evaluación depende del tejido, célula o fluido de interés pues cada uno tiene un sistema antioxidante característico (Quintanar y Calderon, 2009).

Metodología

Obtención, aislamiento y tratamiento de eritrocitos

El proceso para la obtención de muestra contará con el formato de consentimiento informado y la aprobación del comité de ética USTA.

Los ensayos se realizarán a partir de muestras biológicas, específicamente se realizará una venopunción a pacientes donadores sanos con edades entre 24-27 años, no fumadores, no medicados y no consumidores de bebidas alcohólicas (Rodrigues et al., 2014), previa firma de consentimiento informado. Se tomará la muestra en tubo con anticoagulante EDTA o heparina y se procederá a procesar en un tiempo no mayor a 2 horas.

La sangre entera se centrifugará a 1200 rpm por 10 minutos a $4^\circ C$, y se procederá a retirar el plasma y el paquete de glóbulos blancos y plaquetas. Los eritrocitos se lavarán con buffer tamponado pH 7.4 (PBS) tres veces y se resuspenderán en una solución 10% v/v (Maheshwari et al., 2019).

Disposición de residuos

Los residuos biológicos que se generen en los procedimientos de laboratorio para el desarrollo del proyecto se gelificarán usando el producto comercial “Biosorb” y se dispondrán en el galón de residuos anatomopatológicos que serán recogidos por servicios generales (encargada del laboratorio en la UAN) y quién transportará dicho recipiente en

bolsa roja rotulada al centro de acopio de la Universidad, mientras lo recoge la empresa contratada para tal fin (Ecocapital). Estos procedimientos están estandarizados en la UAN. Los residuos provenientes de los procesos de síntesis química se dispondrán de acuerdo a los procedimientos establecidos en la UAN, para lo cual se cuenta con contenedores certificados incluidos en los servicios de Ecocapital.

Preparación de soluciones de pesticidas y resorcinarenos

Se prepararán soluciones de cada uno de los resorcinarenos en buffer TBS a partir de las cuales se obtendrán cantidades requeridas para tener concentraciones (se propone entre 0.01 y 0.1 M) en la muestra de eritrocitos.

En el caso de nicotina se preparará una solución en TBS, a partir de la cual se obtendrán concentraciones en la muestra propuesta entre 8 y 20 mg.

El glifosato y AMPA se prepararan en buffer TBS para obtener concentraciones que se proponen entre 0.01–5 mM en la muestra (Kwiatkowska, 2014).

Interacción eritrocitos con pesticidas y resorcinarenos

La metodología se llevará a cabo teniendo en cuenta lo reportado Maheshwari (2019) con algunas modificaciones. Los eritrocitos se incubaran con cada uno de los compuestos de interés en las concentraciones mencionadas anteriormente, durante 4 h a 37°C en baño de agua con agitación. También se contará con muestra control de eritrocitos, es decir, muestras de eritrocitos bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura pero sin los xenobióticos. Finalizada la incubación, se separaran los eritrocitos por centrifugación, se realizaran lavados con buffer y se provocará su rompimiento por adición de buffer hipotónico). El material de interés obtenido se separará por centrifugación y se almacena a -20 °C (Maheshwari, 2019).

Degradación de grupo hemo

Hemolizados se diluyen 20 veces con buffer TBS y se mide su fluorescencia a 480 nm utilizando 325 nm como longitud de onda de excitación (Nagababu et al, 2008). La cantidad de hierro liberado se cuantificará usando ferrozina la cual produce un complejo color rosa con absorbancia a 550 nm.

Oxidación de proteína

Se cuantificará tratando la muestra con 2-4 dinitrofenilhidrazina, la cual da un complejo de hidrazona que absorbe a 360 nm. Los productos de la oxidación (AOPP) se cuantificarán por espectrofotometría a 340 nm. Grupos amino libres se evaluarán realizando lecturas a 420 nm de los productos de color amarillo formados por la adición de 2,4,6-trinitrobencenosulfonato (Maheshwari, 2019).

Actividad catalasa

La actividad de la catalasa se determinará siguiendo el decrecimiento de la absorbancia resultado de la descomposición de H₂O₂ a 240 nm cada tres segundos durante 30 segundos de acuerdo a Aebi (1984). La actividad CAT se expresará como mM H₂O₂ consumida min⁻¹mg proteína⁻¹

Porcentaje de Hemólisis

El porcentaje de hemólisis se determinará tal y como lo describe Pieniazek et al. (2004).

Poder antioxidante

Se llevará a cabo por el método del ABTS. La muestra es tratada con solución 7 mM de ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM en la oscuridad. Posteriormente, esta solución se diluye con TBS y se adicionará el hemolizado. Se obtendrá una solución de color púrpura. Se evaluará la absorbancia con espectrofotómetro a 734 nm durante 5 min. Los resultados se reportarán como en trolox equivalentes por mg de Hb (Re et al 1999).

Integridad de eritrocitos Microscopía

Se realizará observación de los eritrocitos tratados por microscopia electrónica con el fin de observar anomalías en la estructura celular. Aquí los eritrocitos se lavarán tres veces con PBS y se fijarán con glutaraldehído por 1 hora a temperatura ambiente (Maheshwari et al., 2019). Se realizarán lavados con PBS y luego puestas sobre láminas de vidrio, secadas, lavadas con etanol y cubiertas con oro, para posteriormente ser leídas a una magnificación de 2500X.

Análisis estadístico

Todos los análisis se reportarán como el promedio de triplicados +/- S. Se realizará un análisis estadístico ANOVA usando el software SPSS. Un nivel de probabilidad P< 0.05 para establecer diferencias estadísticamente significativas. Todos los experimentos se llevarán a cabo con muestras de un solo donante.



Presupuesto

FINANCIACIÓN	RECURSO	DESCRIPCIÓN	Valor partida	Valor contrapartida (Externa)	Total (\$)
RUBROS	Servicios Técnicos	*Paquete de análisis microscópico	\$4.000.000		\$ 6.000.000
		*Desarrollo de software	\$2.000.000		
	Salidas de campo				
	Equipos			\$2.000.000	\$ 2.000.000
	Materiales, insumos y software	Reactivos: Nicotina, Glifosato, AMPA, Buffers, Ferrozina, ABTS 2-4 dinitrofenilhidrazina 2,4,6-trinitrobencenosulfonato	\$1.800.000		\$ 1.800.000
BOLSAS	Papelería				
	Fotocopias				
	Material bibliográfico				
	Auxilio de transporte				
	Movilidad	Ponencias para socialización			
	Publicaciones (Artículos, proceso editorial y traducción)	Traducción de artículos			
TOTAL DEL PROYECTO:					\$9.800.000

Presupuesto					
Horas nómina					
Concepto	Nombre	Escalafón	Horas mes	Sede / Seccional o Externo	Total (\$)
Horas Nomina (Investigador Principal)	Obradith Caiicedo (USTA)	4	80	Bogotá	(10 meses): 29.985.000
Horas Nomina (Co-Investigadores)	Andrés Malagón B. (UAN)	Docente investigador	48	Bogotá	25.000.000
	Yuly Elien Bernal Rosas (UAN)	Docente titular	32	Bogotá	15.000.000

Consideraciones éticas

Anexos

1. *Cartas de aval de las instituciones donde se realiza la investigación o donde se recogen datos/muestras, si aplica.*



Datos generales y vistos buenos a la propuesta

Fecha: Agosto 6 de 2019

Señores
DIRECCION DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN
SEDE PRINCIPAL
Universidad Santo Tomás

A continuación, comunicamos que la propuesta titulada “Estudio *in vitro* de la alteración de eritrocitos humanos por pesticidas de uso extendido y moléculas macrocíclicas”. se presenta a la DECIMOQUINTA CONVOCATORIA PARA EL FOMENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y LA INNOVACIÓN 2020. Esta ha sido evaluada por el Comité de Investigación del Departamento de Ciencias Básicas el día 06/08/2019 y se determinó que cumple con todos los requisitos exigidos en la misma.

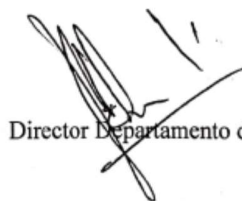
Adicionalmente la propuesta cuenta con el visto bueno del líder del grupo CIM (Ciencia e Ingeniería de Materiales), profesor Fabio Castillejo, y del director del Departamento de Ciencias Básicas, Ing. Nelson Rojas, quien asignará a los investigadores las horas de acuerdo con la siguiente distribución:

Docente	Rol	Número de horas a asignar en 2020
Obradith Caicedo Orjuela	Investigadora principal	80 /mes

Atentamente



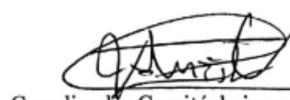
Investigador principal



Director Departamento de Ciencias Básicas



Líder del grupo de investigación



Coordinador Comité de investigación
Departamento de Ciencias Básicas

2. *Formato de consentimiento informado y/o asentimiento (cuando la investigación lo amerite).*

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA VENOPUNCIÓN

¿Por qué se realiza toma de muestra?

El proyecto hace parte de una Convocatoria interna de la Universidad Santo Tomás, titulado: Estudio *in vitro* de la alteración de eritrocitos humanos por pesticidas de uso extendido y moléculas macrocíclicas. Acá se pretende evaluar el efecto de algunos compuestos químicos y moléculas encontradas en el ambiente (Resorcinarenos sulfonados sobre los efectos de nicotina, glifosato, AMPA) sobre los eritrocitos humanos.

Se pretende contribuir al conocimiento del impacto de este tipo de moléculas sobre la salud del ser humano y el potencial de los resorcinarenos como moléculas coadyuvantes o sinérgicas en la interacción con los pesticidas.

De acuerdo a los objetivos planteados se hace necesario tomar muestra de sangre para lo cual contamos con la Bacterióloga quien es el personal de Salud autorizado y calificado para realizar el procedimiento.

¿Cómo se realizará la toma de muestra?

En primera instancia la Bacterióloga realizará una serie de preguntas al voluntario, con el fin de conocer si sufre de alguna patología, o si posee algún antecedente médico. Luego de evaluar que el voluntario se encuentra en las condiciones adecuadas para la donación, se le explicará el procedimiento y se realizará la extracción.

La punción venosa es la recolección de una muestra de sangre que se obtiene punzando una vena (el sitio de punción más común es el brazo). Las venas son vasos sanguíneos que se encuentran cerca de la superficie de la piel y por su estructura tienen un color azulado. El área se limpia con un líquido antiséptico (como lo es el alcohol) y un algodón después se realiza una punción con una aguja nueva y estéril la cual es dirigida a la vena para luego

recoger la sangre en un contenedor (tubo pequeño de plástico estéril), finalmente, se retira la aguja y se coloca un algodón con alcohol nuevamente para evitar algún sangrado y dejar limpia la zona.

NOTA: Si usted decide facilitar una muestra de sangre para este estudio, se marcará el tubo con código especial el cual no revelará su nombre, tan solo la fecha y número de muestra. Luego nosotros extraeremos alrededor de 4 ml de sangre de una vena de su antebrazo. La sangre será llevada al laboratorio de la UAN donde se realizará el procedimiento de análisis.

¿Qué efectos secundarios se pueden presentar después de la toma de muestra?

- Dolor en el sitio de punción: Todo procedimiento médico invasivo, por mínimo que sea, puede provocar dolor. La percepción del mismo varía en cada individuo, siendo más pronunciado en algunas personas.
- El estrés generado por la toma, con frecuencia es mayor que la punción en sí.
- Desmayo, palidez e hipotensión: Antes, durante o después de la toma de muestra, algunos individuos pueden presentar los efectos adversos mencionados, debido principalmente al nerviosismo o ansiedad que causan este tipo de procedimientos.
- Aparición de hematoma en la zona de punción.

NOTA: Muchos de los pacientes suelen presentar mayor dolor al momento del procedimiento, debido a que por la ansiedad que presentan, realizan movimientos bruscos los cuales causan mayores lesiones al momento de la punción.

CERTIFICADO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Soy Mayor de 18 años, acepto participar y donar una muestra de sangre para el desarrollo de este proyecto. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y siento que todas mis inquietudes al respecto han sido resueltas. Entiendo que el donar una muestra de sangre es mi elección y comprendo los riesgos que se pueden presentar durante y después de la toma de muestra.

Confirmando que he leído la sección de cómo se realiza la toma, que efectos secundarios se pueden presentar y conozco que mi información personal y los resultados que resulten de mi persona serán confidenciales y, por tanto, acepto que mi muestra de sangre sea utilizada para fines de investigación y acepto voluntariamente participar en este estudio y entiendo que tengo derecho de retirarme del mismo en cualquier momento sin que esto afecte en alguna forma mi servicio médico Sí ____ No ____

Nombre del Participante: _____

Tipo de identificación: ____ N° de identificación: _____

Edad: _____ Sexo: ____ N° de celular/ teléfono: _____

Departamento/Municipio: _____ Dirección residencia: _____

Firma del Participante: _____

En caso de emergencia llamar a: _____

Vínculo: _____ Teléfono de contacto: _____

Nombre del Testigo: _____

Firma del Testigo: _____

(Seleccionado por el participante y sin nexos con el grupo de investigación).

Nombre del Encuestador: _____

Firma del Encuestador: _____

Fecha ____ / ____ / ____ (dd/mm/aa)

3. *Hojas de vida de los investigadores, según el formato dispuesto.*

Obradith Caicedo Orjuela. Docente investigadora U. Santo Tomás.

http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000729191

Edwin Andres Malagón Bernal. Docente investigador U. Antonio Nariño

http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000713287

Yuly Bernal. Docente U. Antonio Nariño

http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000981230

Bibliografía

Aebi, H. Methods in enzymology, vol. 105. Copyright © 1984 by academic press. inc. methods in enzymology, vol. 105 all rights of reproduction in any form reserved, isbn 0.12-182005-x.

Alkam, T., Nabeshima, T. (2019). Molecular mechanisms for nicotine intoxication. *Neurochemistry International*. 125, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.02.006>

De Moura, F., Da Silva, R., Da Costa M., Aguiar, D., Sugui, M., Senhorin, A., Senhorin, V. (2017). Effects of glyphosatebased herbicide on pintado da amazônia: hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *environmental toxicology and pharmacology*. 56. 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.019>.

Faraga, M.R., Alagawany, M. (2018). Erythrocytes as a biological model for screening of xenobioticstoxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 279, 73–83.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>.

Grandcoin, A., Ephanie, S., Baures, E. (2017). Aminomethylphosphonic acid (AMPA) in natural waters: its sources, behavior and environmental fate. *Water Research*. 117, 187-197.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055>.

Han, X., Park, J., Wu, W., Malagón, A., Wang, I., Vargas, E., Wikramanayake, A., Houk, K.N., Leblanc, R.M. (2017). A resorcinarene for inhibition of $\alpha\beta$ fibrillation. *Chem. Sci.* 8, 2003-2009.

Kurenbach, B., Marjoshi, D., Amábile-Cuevas, C.F., Ferguson, G.C., Godsoe, W., Gibson, P., Heinemann, J.A. (2015). Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *MBIO* 6(2) e00009-15. doi:10.1128/mbio.00009-15.

Kwiatkowska, M., Huras, B., Zena, B. (2014). The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. xxx, xxx-xxx. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.01.003>.

Luttrell, W., Vogel, H. (2014). Nicotine. *Journal of Chemical Health & Safety*. July/August. 39-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchas.2014.05.006>

Maheshwari, N., Khan, F., Mahmood, R. (2019). Pentachlorophenol-induced cytotoxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, lowered antioxidant power, inhibition of glucose metabolism, and morphological changes. *Environmental Science and Pollution Research*. 26, 12985-13001. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04736-8>.

Nagababu, E., Fabryme, M., Nagel, R.L., Rifkind, J.M. (2008). Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 41, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.12.003>.

Padmavathi, P., Reddy, V.D., Kavith, G., Paramahansa, M., Varadacharyulu, N. (2010). Chronic cigarette smoking alters erythrocyte membrane lipid composition and properties in male human volunteers. *Nitric Oxide* 23, 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.05.287>

Pieniazek D., Bukowska B., Duda W. (2004). Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 79: 58-63.

Quintanar, M., Calderón, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. REB. 28(3) 89-101. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/490/49016098004.pdf>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 26, 1231–1237.

Rodrigues H., Penha-Silva N., Ferreira M., Nishijo H., Aversi-Ferreira T. (2014). Effects of Roundup® Pesticide on the Stability of Human Erythrocyte Membranes and Micronuclei Frequency in Bone Marrow Cells of Swiss Mice. The Open Biology Journal. 4:54-59.

Sanabria, E., Maldonado, M. (2019). Calixarenes: Generalities and Their Role in Improving the Solubility, Biocompatibility, Stability, Bioavailability, Detection, and Transport of Biomolecules. Biomolecules, 9(3), 90-95. doi: [10.3390/biom9030090](https://doi.org/10.3390/biom9030090)

Sepasi, H., Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. Progress in Biophysics and Molecular Biology. xxx, 1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>

Sikdar, J., Seal, P., Roy, A., Haldar, R. (2017). Cigarette smokers develop altered erythrocyte membrane composition: an investigation unmasking the role of membrane bound integral protein glut 1. Free Radical Research, 51, (4) 375–388
<https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1321744>

Steinticken, H.C., Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 94, (4) 1207-1212. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(80\)90547-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(80)90547-1).

Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., Morris, J.G. jr. (2018). Review. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. Science of the total Environment 616–617. 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>.

Vasylykiv, O.Y., Kubrak, O., Storey, K., Lushchak, V. (2011). Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. Pesticide Biochemistry and Physiology. 101, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.005>.

Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroither, M., Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Obinger, C. (2010). Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 500, 74-81. <https://doi:10.1016/j.abb.2010.04.018>

.Yarahmadi, A., Zal, F., Bolouki, A. (2017). Protective effects of quercetin on nicotine induced oxidative stress in 'hepg2 cells'. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 27 (8) 609–614. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1344338>.

Zhan, H.,Feng, Y., Fan, X., Chen, S. (2018). Recent advances in glyphosate biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102:5033–5043 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>.