



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Tesis Doctoral

**“*Larrea divaricata* Cav.: Estudio de la actividad
antioxidante frente a estrés oxidativo inducido y estudio de
los parámetros farmacocinéticos”**

Autor: Bioq. Ignacio Nahuel Peralta

Directora: Dra. Claudia Alejandra Anesini

Co-directora: Dra. María Rosario Alonso

Lugar de Trabajo:

Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (UBA-CONICET)
Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.

2019

*“A cada instante habrá una flor,
y en cada flor habrá un instante”*

Gustavo “Chizzo” Napoli

A la memoria de mi hermano Agustín

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia Anesini, por enseñarme sin lecciones y transmitirme sin palabras. Por escucharme, esperarme y respetarme. Por tu entrega personal y compromiso emocional. Por haberme hecho lo que soy, eternamente agradecido.

A la Dra. Carla Marrassini, por tus silencios y tus palabras.

A la Dra. Rosario Alonso, por recibirme siempre con una sonrisa.

Al Dr. Renzo Martino, por tus enseñanzas y tu compañerismo.

A Yanina, por tu pasión animal.

A toda la Catedra de Farmacognosia, toda.

A todo el personal de apoyo del IQUIMEFA.

A Fede Setter, por poner su amistad y su arte en esta tesis.

A Vicky, por ayudarme a creer.

Al Dr. "Lauta" Bracco, por nuestro pasado, presente y futuro.

Al Dr. "Doc" Gugliucci, por tu fraternidad rioplatense.

A todos los que me mostraron quien no quiero ser.

A mis viejos, por educarme para ser lo más feliz que pueda y ayudarme a lograrlo.

A mis hermanos y hermanas.

A la muerte, por sus instrucciones de vida.

A los pibes, por no dejarme olvidar mi esencia.

PUBLICACIONES

Peralta I., Marrassini C., Filip R., Alonso M.R., Anesini C., 2018. Food Preservation by *Larrea divaricata* extract: Participation of Polyphenols. Food Science and Nutrition. Vol 6 (5), p.1269-1275.

Alvarez Echazú M.I., Olivetti C., **Peralta I.**, Alonso M.R., Anesini C., Perez C., Alvarez G., Desimone M., 2018. Development of pH-responsive Biopolymer-silica composites loaded with *Larrea divaricata* Cav. extract with Antioxidant Activity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 169: 82-91.

Alonso M.R., **Peralta I.**, Monti D., Martino R., Anesini C., 2017. Stability of an Aqueous Extract of *Larrea divaricata* Cav. during a Simulated Digestion Process. Phytotherapy Research. Vol. 31 (11), p. 1708-1714.

Peralta I., Martino R., Davicino R., Gorzalczy S., Alonso R., Anesini C., 2015. Systemic and Local Toxicity Assay of an Aqueous Extract of *Larrea divaricata* Cav.: Role of NDGA. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. Vol 6, Issue 7, p. 2790-2798.

Davicino R., **Peralta I.**, Martino R., Alonso R., Anesini C., 2015. Preventive Anti-inflammatory Activity of an Aqueous Extract of *Larrea divaricata* Cav. and Digestive and Hematological Toxicity. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. Vol. 6 (8), p. 3215-3223.

Peralta I., Martino R., Zettler G., Alonso R., Filip R., Anesini C., 2013. Modulator Activity of an Aqueous Extract from *L. divaricata* Cav. on Basal Oxidative and Anti-oxidative Parameters of Normal Rat Submandibular Glands. International Journal of Indigenous Medicinal Plants. Vol. 46, p 1363-1369.

Alonso M.R., **Peralta I.**, Lemos R., Davicino R., Anesini C., 2012. Influence of environment conditions on the chemical composition and antioxidant activity of *Larrea divaricata* aqueous extract. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. Vol 6, p. 28-32.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Alonso MR., **Peralta I.**, Martino R., Monti D., Marrassini C., Anesini C., 2017. Polyphenol-rich *Larrea divaricata* Cav extracts as skin and hair care agents against oxidative stress and melanomas. 8th International Conference on Polyphenols and Health. ICPH, Quebec, Canada.

Peralta I., Monti D., Alonso M.R., Anesini C., 2016. Estabilidad de un Extracto Acuoso de *Larrea divaricata* Cav. Sometido a Digestión Simulada. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Argentina.

Peralta I., Monti D., Lemos R., Anesini C., 2015. Antioxidant Activity of Aqueous Extracts of *Larrea divaricata* Cav. from Different Regions of Argentina: Participation of Polyphenols. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Ciudad de Córdoba, Argentina.

Peralta I., Marrassini C., Alonso M.R., Anesini C., 2014. Efecto modulador de *Larrea divaricata* Cav. sobre la proliferación de linfocitos tumorales y normales en ausencia y presencia de glucosa. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Ciudad de Corrientes, Argentina.

Alonso M.R., **Peralta I.**, Anesini C., 2011. Estudio de la Estabilidad de un Extracto Acuoso de *Larrea divaricata*: Relación entre la Composición Química y la Actividad Antioxidante. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Tucumán, Argentina.

ABREVIATURAS

O₂: Oxígeno

ERO's: Especies Reactivas del Oxígeno

RL: Radicales Libres

O₂^{*-}: Radical Anión Superóxido

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

OH^{*}: Radical Hidroxilo

ERN's: Especies Reactivas del Nitrógeno

ERC's: Especies Reactivas del Cloro

ER's: Especies Reactivas

EROyN's: Especies Reactivas del Oxígeno y del Nitrógeno

TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral Alpha

MAPK: Proteína Quinasa activada por Mitógenos

PKC: Proteína Quinasa C

ERK: Quinasa Regulada por Señales Extracelulares

p38: Quinasa p38 Activada por Mitógenos

ON: Óxido Nítrico

SOD: Superóxido Dismutasa

CAT: Catalasa

GPx: Glutatión Peroxidasa

GSH: Glutatión Reducido

GSSG: Glutatión Disulfuro

ROOH: Peróxido

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AGE's: Productos de Glicación Avanzada (Advanced Glycosilation End products)

JNK: Quinasas c-JUN N-terminal

IKκβ: Inhibidor de la Quinasa del Factor de Transcripción Nuclear kappa (subunidadβ)

DM: Diabetes Mellitus

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad

ApoB: Apoproteína B

VLDL: Lipoproteína de muy Baja Densidad

VCAM-1: Proteína 1 de Adhesión a Células Vasculares
MCP-1: Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1
Treg: Linfocitos T reguladores
Th1: Linfocitos Colaboradores 1
HDL: Lipoproteína de Alta Densidad
ApoA1: Apoproteína A1
ApoE: Apoproteína E
SCN⁻: Tiocianato
OSCN⁻: Anión Hipotiocianato
ACE: Enzima de Conversión de Angiotensina
NDGA: Acido nordihidroguayaretico
ExA: Extracto Acuoso de *Larrea divaricata* Cav.
STZ: Estreptozotocina
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
NMU: N-nitroso N-metil Urea
TPA: 12-O-tetradecanoyphorbol-13-acetato
i.p.: vía intraperitoneal
SFB: Suero Fetal Bovino
CO₂: Dióxido de Carbono
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
BHT: Butilhidroxitolueno
TCA: Acido Tricloroacético
TBA: Acido Tiobarbitúrico
TBARS: Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
EDTA: Acido Etilendiaminotetraacético
PON-1: Paraoxonasa 1
SIN-1: 3-morphosydnonimine-N-ethylcarbamide
LDH: Lactato deshidrogenasa
AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
WB: Westernblot

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	12
1.1. Especies reactivas y sistemas antioxidantes.....	12
1.2. Estrés oxidativo: Patologías asociadas.....	16
1.2.1. Origen de la Diabetes.....	16
1.2.2. Complicaciones y patologías asociadas a la Diabetes Mellitus.....	17
1.2.3. Diabetes y Aterosclerosis.....	18
1.2.4. Alteración de las glándulas salivales.....	19
1.2.5. Drogas antioxidantes para el tratamiento de la Diabetes.....	20
1.2.6. Plantas medicinales con actividad antioxidante y efectos antidiabéticos.....	20
1.3. <i>Larrea divaricata</i> Cav.	21
1.3.1. Características generales.....	21
1.3.2. Descripción botánica.....	21
1.3.3. Distribución geográfica.....	23
1.3.4. Usos populares.....	24
1.3.5. Estudios fitoquímicos previos.....	24
1.3.6. Estudios farmacológicos previos.....	25
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	27
2.1. Hipótesis.....	27
2.2. Objetivo general.....	27
2.3. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIALES Y METODOS	29
3.1. Materiales.....	29
3.1.1. Droga Vegetal.....	29
3.1.2. Obtención del extracto acuoso de <i>L. divaricata</i> (ExA).....	29
3.1.3. Cultivo de Macrófagos de línea celular.....	29
3.1.4. Uso de Animales de Laboratorio.....	29
3.2. Métodos.....	29
3.2.1. Estudios Fitoquímicos de ExA.....	29
3.2.1.1. Identificación y cuantificación de NDGA y Rutina por HPLC.....	29
3.2.1.2. Identificación de otros compuestos presentes en ExA por HPLC.....	30
3.2.1.2.1. Método 1: INTI.....	30
3.2.1.2.2. Método 2: CIDEC- FFyB.....	22
3.2.1.3. Determinación de polifenoles totales.....	30

3.2.1.4. Determinación de flavonoides totales.....	31
3.2.1.5. Composición Nutricional y Mineral.....	31
3.2.2. Ensayos de actividad antioxidante general de ExA y NDGA.....	32
3.2.2.1. Calculo de la concentración efectiva media.....	32
3.2.2.2. Actividad Eliminadora de radicales libres.....	32
3.2.2.3. Inhibición de la lipoperoxidación.....	33
3.2.2.3.1. Determinación de TBARS del ácido linoleico.....	33
3.2.2.3.2. Determinación de TBARS de yema de huevo.....	33
3.2.2.4. Interferencia con metales (Poder reductor).....	34
3.2.2.5. Inhibición de la formación de AGE's.....	34
3.2.2.6. Actividad símil enzimas antioxidantes.....	34
3.2.2.6.1. Actividad símil catalasa.....	35
3.2.2.6.2. Actividad símil peroxidasa.....	35
3.2.2.6.3. Actividad símil superóxido dismutasa.....	36
3.2.2.7. Activación de enzimas antioxidantes.....	36
3.2.2.7.1. Velocidad máxima de Px estándar pura.....	36
3.2.2.7.2. Velocidad máxima de SOD estándar pura.....	36
3.2.2.7.3. Velocidad máxima de CAT estándar pura.....	37
3.2.2.8. Actividad protectora de lipoproteínas plasmáticas.....	37
3.2.2.8.1. Preparación de plasma y lipoproteínas.....	37
3.2.2.8.2. Aislamiento LDL y HDL humana.....	37
3.2.2.8.3. Actividad PON-1 frente a estrés oxidativo y nitrosativo.....	38
3.2.2.8.4. WB de ApoA-1 en presencia de SIN-1.....	38
3.2.2.8.5. Oxidación de la LDL por CuSO ₄	38
3.2.2.8.6. Determinación de TBARS de la LDL.....	38
3.2.3. Ensayos de actividad antioxidante en cultivos de Macrófagos.....	39
3.2.3.1. Determinación de Proliferación celular.....	39
3.2.3.2. Determinación de Nitritos totales.....	39
3.2.3.3. Determinación del Factor de Necrosis Tumoral α	39
3.2.3.4. Determinación de Glutación reducido.....	39
3.2.3.5. Determinación de ERO's intracelulares.....	40
3.2.3.6. Determinación de TBARS.....	40
3.2.3.7. Determinación de Citotoxicidad.....	40

3.2.4. Ensayos de actividad antioxidante en glándulas submandibulares de rata.....	40
3.2.4.1. Preparación y tratamiento de las glándulas submandibulares.....	41
3.2.4.2. Determinación de los parámetros oxidativos.....	41
3.2.4.2.1. Peróxido de hidrógeno.....	41
3.2.4.2.2. Anión superóxido.....	41
3.2.4.2.3. Óxido nítrico	41
3.2.4.3. Determinación de la peroxidación lipídica.....	41
3.2.4.4. Determinación de la oxidación de proteínas.....	41
3.2.4.5. Actividad enzimática glandular.....	43
3.2.4.5.1. Actividad Peroxidasa.....	43
3.2.4.5.2. Actividad Superóxido Dismutasa.....	43
3.2.4.5.3. Actividad Catalasa.....	44
3.2.4.6. Determinación de Glutación reducido.....	44
3.2.4.7. Parámetros bioquímicos.....	44
3.2.4.8. Estudios histológicos.....	44
3.2.4.9. Análisis de la expresión de Peroxidasa.....	45
3.2.4.10. Análisis de la expresión de la Sintasa de Óxido Nítrico Inducible.....	45
3.2.4.11. Análisis estadístico.....	45
3.2.5. Estudios Farmacológicos “in vivo”.....	46
3.2.5.1. Estudio de la toxicidad sub-crónica de ExA.....	46
3.2.5.2. Modelo de Diabetes inducida por estreptozotocina en ratones.....	46
3.2.5.2.1. Inducción de la diabetes por administración de estreptozotocina.....	46
3.2.5.2.2. Determinación de la glucemia.....	47
3.2.5.2.3. Determinaciones plasmáticas.....	47
3.2.5.2.3.1. Determinación del colesterol total.....	47
3.2.5.2.3.2. Determinación de los triglicéridos totales.....	47
3.2.5.2.3.3. Determinación de lipoperóxidos plasmáticos (TBARS).....	47
3.2.5.2.4. Estudios histológicos.....	47
3.2.5.2.4.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	48
3.2.5.2.5. Análisis estadístico.....	48
3.2.6. Estudios Farmacocinéticos.....	49
3.2.6.1. Método cromatográfico para la determinación de NDGA en plasma de rata.....	49
3.2.6.2. Ensayo de digestión gastrointestinal simulada.....	50
3.2.6.2.1. Preparación de los medios gástrico e intestinal.....	50

3.2.6.2.2. Incubación de ExA en fluido gastrointestinal simulado.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Estudios fitoquímicos de ExA.....	51
4.1.1. Identificación y cuantificación de NDGA y Rutina por HPLC.....	51
4.1.2. Cuantificación de flavonoides y polifenoles totales.....	54
4.1.3. Identificación de compuestos por HPLC.....	54
4.1.3.1. Método 1: INTI.....	54
4.1.3.2. Método 2: CIDECA.....	56
4.1.4. Composición nutricional y mineral de ExA.....	58
4.2. Actividad antioxidante general de ExA y NDGA.....	59
4.2.1. Actividad eliminadora de radicales libres.....	59
4.2.2. Inhibición de la peroxidación lipídica.....	60
4.2.2.1. Inhibición de la formación de TBARS del ácido linoleico.....	60
4.2.2.2. Inhibición de la formación de TBARS de yema de huevo.....	61
4.2.3. Interferencia con metales (Poder reductor).....	62
4.2.4. Actividad inhibidora de AGE's.....	62
4.2.5. Actividad similar a enzimas antioxidantes.....	63
4.2.6. Efecto sobre la activación de enzimas antioxidantes.....	66
4.2.7. Actividad protectora de lipoproteínas plasmáticas.....	68
4.2.7.1. Efecto sobre la función de HDL ante estrés oxidativo y nitrosativo inducido.....	68
4.2.7.2. Efecto sobre la estructura de HDL ante estrés nitrosativo inducido.....	69
4.2.7.3. Efecto sobre la oxidación de LDL inducida por Cu ⁺⁺	70
4.3. Actividad antioxidante sobre macrófagos bajo estrés oxidativo inducido por glucosa.....	71
4.3.1. Efecto de ExA y NDGA sobre la proliferación celular.....	71
4.3.2. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de óxido nítrico.....	72
4.3.3. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de ERO's.....	74
4.3.4. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de TBARS.....	75
4.3.5. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción del TNF- α	76
4.3.6. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de Glutatión reducido.....	77
4.3.7. Efectos sobre la citotoxicidad bajo estrés inducido por SIN-1 y AAPH.....	78
4.4. Estudio de la actividad antioxidante en glándulas submandibulares de rata.....	79
4.4.1. Efectos del ExA y NDGA sobre parámetros oxidativos en glándulas de ratas normales... 79	
4.4.1.1. Efecto sobre especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.....	79
4.4.1.2. Efecto sobre la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas.....	80

4.4.2. Efecto de ExA y NDGA sobre parámetros antioxidantes en glándulas de ratas normales..	82
4.4.2.1. Sobre sistemas enzimáticos glandulares.....	82
4.4.2.2. Sobre sistemas no enzimáticos.....	83
4.4.3. Efecto de ExA y NDGA en un modelo de estrés oxidativo inducido en glándulas subman- dibulares por la administración de estreptozotocina.....	84
4.4.3.1. Efecto sobre el peso y el contenido de proteínas.....	86
4.4.3.2. Efecto sobre las especies reactivas del oxígeno.....	86
4.4.3.3. Efecto sobre la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas.....	88
4.4.3.4. Estudios histológicos.....	89
4.4.3.5. Efecto sobre los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.....	89
4.4.3.6. Efecto sobre la expresión de Px e iNOS.....	91
4.5. Efectos de ExA en un modelo de estrés oxidativo inducido por estreptozotocina “in vivo”.....	92
4.5.1. Estudio de la toxicidad sub-crónica de ExA y NDGA.....	92
4.5.2. Efecto sobre la glucemia y sobre el peso corporal en animales sanos.....	94
4.5.3. Efecto de ExA en animales con diabetes inducida.....	94
4.5.3.1. Efectos sobre la glucemia.....	95
4.5.3.2. Efectos sobre el peso corporal.....	96
4.5.3.3. Efectos sobre el metabolismo lipídico.....	97
4.5.3.4. Efectos sobre la peroxidación lipídica.....	98
4.5.3.5. Efectos sobre los niveles de GSH.....	99
4.5.3.6. Estudios histológicos.....	100
4.6. Estudios Farmacocinéticos.....	101
4.6.1. Desarrollo de método para la determinación de NDGA en plasma de rata.....	101
4.6.1.1. Validación del método de clean up.....	101
4.6.1.2. Cuantificación de NDGA en ratas tratadas con ExA por vía oral.....	102
4.6.2. Estabilidad y solubilidad de ExA en medio gastrointestinal.....	103
5. DISCUSION.....	105
CONCLUSIONES.....	127
RESUMEN.....	129
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

1. INTRODUCCION

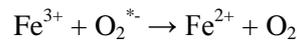
1.1. Especies reactivas y sistemas antioxidantes

Debido a su configuración electrónica el oxígeno tiende a ganar electrones y, por lo tanto, es un potente oxidante. Durante el proceso de respiración celular (fosforilación oxidativa) el O_2 es progresivamente reducido a partir de un suministro controlado de cuatro electrones para producir agua. Sin embargo, es posible que ocurra una reducción incompleta del O_2 que conduce a la formación de entidades químicas que continúan siendo oxidantes. Estas moléculas son conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO's).

Algunas de estas especies actúan como radicales libres (RL) que pueden ser definidos como moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados, lo que les confiere un alto grado de reactividad (Swaran, 2009). A través de una, dos o tres reducciones de electrones, el oxígeno puede generar sucesivamente el O_2^{*-} (radical anión superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogeno) o OH^* (radical hidroxilo). La producción de los distintos radicales se vincula a partir de varias reacciones químicas y enzimáticas. La superóxido dismutasa (SOD) convierte el O_2^{*-} en H_2O_2 , y este último puede generar OH^* en presencia de Fe^{2+} , en lo que se conoce como la reacción de Fenton (Morel y Barouki, 1999).

Por otra parte, el O_2^{*-} participa en la reacción de Haber-Weiss, la cual combina la reacción de Fenton y la reducción de Fe^{3+} a partir de O_2^{*-} produciendo Fe^{2+} y O_2 (Swaran, 2009).

El primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del catión férrico a catión ferroso:



El segundo paso es una reacción de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^*$

La reacción (Haber-Weiss) neta es: $O_2^{*-} + H_2O_2 \rightarrow OH^* + OH^- + O_2$

Además de las ERO's existen especies reactivas del nitrógeno (ERN's) y del cloro (ERC's) (Droge, 2011; Freidovich, 1999).

Las especies reactivas (ER's) derivadas de los procesos oxidativos, constituyen una parte integral del metabolismo y se producen continuamente en el organismo como consecuencia del estrés, la irradiación, la inflamación, el ejercicio físico y la injuria celular (Halliwell y col., 1992). También se podría decir que tanto sustancias endógenas como exógenas producen ER's, pudiendo ser iniciadas por reacciones no enzimáticas entre compuestos orgánicos con oxígeno o iniciadas por radiaciones ionizantes (Pham-Huy y col., 2008). Existen fuentes exógenas de ER's como los efluentes industriales y el humo del cigarrillo, y fuentes endógenas derivadas de macrófagos y neutrófilos, además de la fosforilación oxidativa (Sen y col., 2010).

Es sabido que las ER's endógenas se producen constitutivamente en las células actuando como señales intracelulares (segundos mensajeros) que llevan a diferentes respuestas como las relacionadas con la modulación del crecimiento celular a través del balance proliferación/muerte celular (Droge, 2002; De Coursey y Ligeti, 2005; Storz, 2005). Por ejemplo, las células fagocíticas como los neutrófilos, al reconocer organismos extraños desencadenan la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (EROyN's) en un episodio llamado estallido respiratorio, inducido por citoquinas, factores de crecimiento (como el nervioso, el plaquetario y el fibroblástico), interleuquinas, angiotensina, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), angiotensina II, factor transformante del crecimiento, factor

estimulador de colonia de macrófagos y de granulocitos (Thannickal y Fanburg, 2000), que lleva a la destrucción de patógenos.

También, en células no fagocíticas las ERO's participan en el camino intracelular de las MAPK (proteín quinasas activadas por mitógeno) (Sun y Oberley, 1996). Ciertos factores de crecimiento y citoquinas que se unen a diversos tipos de receptores actúan a través de ERO's como señales intracelulares reguladoras de la proliferación y la muerte celular (Neufeld y col., 1999). Se ha visto que el H_2O_2 y el O_2^{*-} inducen la fosforilación de tirosinas quinasas en fibroblastos, linfocitos T y B, macrófagos y células mieloides. Además, las ERO's estimulan la liberación de calcio, que a su vez se relaciona con los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis (Parekh y Penner, 1997). Por otro lado, las serina/treonina quinasas (PKC) están sometidas a un sistema celular de regulación redox. La activación de PKC por oxidantes desempeña un rol importante en el desarrollo del cáncer. Más aún, el H_2O_2 tiene la capacidad de modular las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y la quinasas activada por mitógenos (p38) cuyo balance lleva a la proliferación o a la apoptosis celular.

Por otro lado, las ERN's producidas por neuronas actúan como neurotransmisores y las generadas por macrófagos actúan como mediadores de la inflamación. Además, son responsables de la adhesión de los leucocitos, la trombosis, la angiogénesis y del tono vascular. Más aún, las ERO's son inducidas por situaciones de estrés como hipoxia, inanición, infecciones y estimulación con factores de crecimiento.

En definitiva, las EROyN's están involucradas en un gran número de respuestas intracelulares (Droge, 2002; Fang y col., 2002) como:

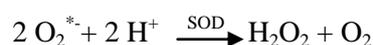
- I) Regulación de la producción redox de óxido nítrico (ON).
- II) Regulación de la hipoxia.
- III) Regulación de la diferenciación celular.
- IV) Regulación de la autofagia.
- V) Regulación redox de la adhesión celular.
- VI) Regulación redox de la respuesta inmune.
- VII) Regulación del envejecimiento.
- VIII) Inducción de la apoptosis, transcripción génica, transducción y regulación de otras funciones celulares.

Si bien el metabolismo basal celular continuamente produce ER's, existen sistemas antioxidantes que actúan como eliminadores de las mismas para prevenir su acumulación y posibles efectos deletéreos (Morel y Barouki, 1999). Un antioxidante es una sustancia capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas (Swaran, 2009).

Se conoce la existencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que contrarrestan el efecto de las EROyN's a nivel celular y molecular. Bajo pequeñas concentraciones específicas inhiben o retrasan los procesos oxidativos interrumpiendo las reacciones en cadena de los radicales. Además, los antioxidantes son quelantes de los iones metálicos responsables de la producción de ERO's ya que tienen el potencial para actuar tanto en la membrana como en el citoplasma.

En cuanto a los antioxidantes enzimáticos, se puede citar principalmente a la Superóxido Dismutasa (SOD), a la Catalasa (CAT) y las Peroxidasas (Px).

La SOD es una enzima presente en todos los organismos que respiran oxígeno y cataliza la dismutación de O_2^{*-} a O_2 y H_2O_2 con una muy alta velocidad de reacción.



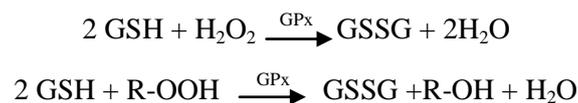
INTRODUCCIÓN

Esta enzima se presenta de 2 formas dependiendo de su ubicación. En las mitocondrias, la SOD se presenta con Mn en su conformación y en el citoplasma, el Cu y el Zn son los metales principales en su estructura. La doble ubicación de la SOD asegura que la mayor parte del radical superóxido sea convertido en H_2O_2 .

La CAT es una enzima presente en las células vegetales, animales y en bacterias aeróbicas y se localiza en una organela celular llamada Peroxisoma. La enzima promueve eficientemente la conversión de H_2O_2 en agua y O_2 .

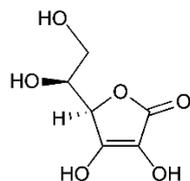


Por otro lado, el metabolismo del Glutati3n es uno de los mecanismos esenciales de la defensa antioxidante. La enzima Glutati3n Peroxidasa (GPx) en presencia de Glutati3n reducido (GSH), agrega dos electrones para reducir el H_2O_2 . La GPx descompone per3xidos en agua o alcohol, mientras que oxida al GSH en simult3neo. Existen al menos 3 formas de GPx: una forma intracelular o celular (GPx-c), una extracelular o plasm3tica (GPx-p) y otra con actividad espec3fica para los fosfolipoper3xidos (GPx-PH) que por lo general est3 asociada a la membrana. Aunque su actividad es la misma poseen diferencias estructurales (Cisneros y col., 1997). Las propiedades antioxidantes de estas enzimas les permiten eliminar per3xidos como sustratos potenciales de la reacci3n de Fenton (formaci3n de radicales libres).

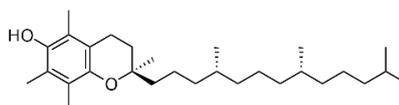


En cuanto a los antioxidantes no enzim3ticos, se puede mencionar a las Vitaminas C y E, el Glutati3n (GSH) y compuestos encontrados en plantas como polifenoles (polifenoles sencillos y flavonoides) y carotenoides.

La Vitamina C (3cido Asc3rbico) es un antioxidante eficaz que elimina las ERO's del medio acuoso a partir de una muy veloz transferencia de electrones que inhibe la peroxidaci3n lip3dica. La Vitamina E posee 8 formas isom3ricas distintas de dos subestructuras, el tocopherol y el tocotrienol. La forma m3s activa de Vitamina E en humanos es la α -tocopherol, la cual es un antioxidante biol3gico muy eficiente, considerado como el antioxidante de membrana m3s utilizado por las c3lulas. Su principal funci3n antioxidante es la protecci3n contra la peroxidaci3n de l3pidos. Tambi3n se report3 que la Vitamina E cumple un rol en la protecci3n contra la toxicidad del Ars3nico (Das y col., 2012).



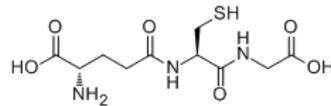
3cido Asc3rbico



α -Tocopherol

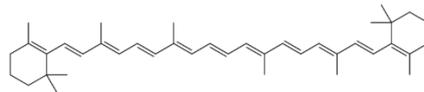
El principal antioxidante tiol es el GSH. Este es un antioxidante no enzim3tico intracelular multifuncional considerado el principal buffer redox tiol-disulfuro de la c3lula. Previene el da3o celular causado por radicales libres, per3xidos, lipoper3xidos y metales pesados. Los grupos tioles reducen las uniones disulfuro de las prote3nas citoplasm3ticas donando un electr3n. En el proceso, el Glutati3n es convertido en su forma oxidada, Glutati3n disulfuro (GSSG).

INTRODUCCIÓN



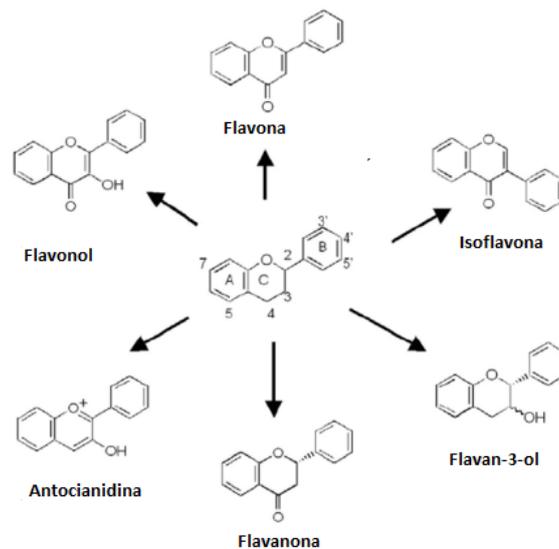
Glutati3n Reducido (GSH)

Los carotenoides son pigmentos que se encuentran en plantas y microorganismos. Varios estudios indican que estos previenen o inhiben ciertos tipos de c3ncer, aterosclerosis, degeneraci3n muscular relacionada con la edad y otras enfermedades. A concentraciones suficientemente altas, los carotenoides pueden proteger a los l3pidos de los daos peroxidativos.



β -Caroteno

Los flavonoides son compuestos polifen3licos con un rasgo estructural com3n, el n3cleo difenilpropano, que consiste en dos anillos arom3ticos unidos a trav3s de tres 3tomos de carbono, que por lo general forman un heterociclo oxigenado. Los compuestos fen3licos que act3an como antioxidantes pueden funcionar como terminadores de las reacciones de los radicales libres, as3 como quelantes de iones met3licos redox-activos que son capaces que catalizar la lipoperoxidaci3n. Una de las propiedades m3s estudiadas de los flavonoides es su capacidad de protecci3n frente al estr3s oxidativo y se sabe que son inhibidores efectivos de la peroxidaci3n (Swaran, 2009). Por ejemplo, hay numerosos estudios que demuestran la capacidad protectora de los flavonoides sobre diversos tejidos. Cabe mencionar que tanto los flavonoides sint3ticos como los dietarios protegen a las c3lulas epiteliales pigmentadas de retinas humanas (RPE) de la muerte inducida por estr3s oxidativo, con eficacias de entre un 80% y un 100% con baja toxicidad. Se ha establecido que los flavonoides act3an a trav3s de una v3a intracelular para bloquear la acumulaci3n de ERO's (Hanneken y col., 2006)



1.2. Estrés oxidativo: Patologías asociadas

1.2.1. Origen de la Diabetes

Se ha demostrado que, si las ER's no se encuentran apropiadamente reguladas, su exceso puede dañar lípidos, proteínas y ADN inhibiendo su normal funcionamiento y dando origen a una situación llamada estrés oxidativo. Como consecuencia, se produce lipoperoxidación, carbonilación y glicación de proteínas, y modificación o ruptura en las bases de ADN que lleva a la pérdida de la eficiencia estructural y funcional de proteínas y a la mutación del ADN.

Por lo tanto, el estrés oxidativo es un disturbio en el balance oxidante-antioxidante que conduce hacia el daño celular en relación a la formación excesiva y/o remoción insuficiente de EROyN's (Johansen y col., 2005).

La mayoría de las células son capaces de tolerar cierto grado de estrés oxidativo debido a que poseen sistemas antioxidantes y/o sistemas de reparación que reconocen y eliminan moléculas dañadas por la oxidación. El desequilibrio puede ser consecuencia de una pérdida de la capacidad antioxidante causada por un exceso de ER's o por problemas en la producción y/o distribución, entre otros factores (Hye-Lin Ha y col., 2010).

Así, el estrés oxidativo conduce a la aparición y progresión de diferentes patologías, entre ellas: enfermedades metabólicas como la Diabetes Mellitus (DM) (Halliwell y col. 1992), hipertensión, enfermedades cardiovasculares, enfermedades oculares (Hodges y col., 1992), cáncer y enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson (Schapira, 1995) y Alzheimer (Lin y col., 2001).

<i>Órganos afectados</i>	<i>Enfermedades relacionadas</i>
Pulmones	Asma, bronquitis crónica
Riñones	Glomerulonefritis, falla crónica renal
Articulaciones	Artritis, inflamación
Cerebro	Alzheimer, Parkinson, pérdida de memoria, depresión, infarto cerebral
Ojos	Cataratas, enfermedad de retina
Feto	Preeclampsia
Corazón	Aterosclerosis, hipertensión, isquemia
Vasos	Cardiomiopatía, falla cardíaca
Multi-órganos	Cáncer, diabetes, inflamación, infecciones, envejecimiento

Tabla 1. Enfermedades relacionadas el estrés oxidativo

Con respecto a las patologías relacionadas con el estrés oxidativo, se conoce el rol del mismo en la patogénesis de la diabetes y el rol de la hiperglucemia en el estrés oxidativo.

La glucosa es un activador del estrés oxidativo. Como consecuencia de los procesos oxidativos que sufre: glicolisis, vía fragmentación de triosa fosfato, vía del poliol, la glucosa da origen al glioxal, metilglioxal y 3-deoxiglucosona, entre otros. Por otro lado, la glucosa produce glicosilación no enzi-

mática de proteínas que se manifiesta por la aparición de hemoglobina glicosilada y fructosamina (Producto de Amadori). Tanto el glioxal, el metilglioxal, la 3-deoxiglucosona y el producto de Amadori pueden sufrir una serie de reordenamientos moleculares (oxidativos y no oxidativos) que llevarían a la producción de productos de glicación tardía (AGE's), aumentando aún más el estrés oxidativo y la alteración de proteínas constitutivas intra y extracelulares. Junto con estos eventos se produce la lipoperoxidación dañando la maquinaria celular y conduciendo a la resistencia a la insulina que da origen a la Diabetes (Erejuwa, 2012; Pham-Huy, 2008; Moussa, 2008).

Entonces se podría definir a la Diabetes como una enfermedad metabólica que se caracteriza por elevados niveles de glucosa en plasma, estrés oxidativo y una insuficiente producción y/o acción de la insulina en el organismo (Maritim y col., 2003). Según la American Diabetes Association, la Diabetes Mellitus se puede clasificar en:

- I) Diabetes tipo I (dependiente de insulina) que se debe a la destrucción de las células beta mediadas por el sistema inmunitario, lo que lleva a una deficiencia de insulina
- II) Diabetes idiopática de tipo I: sin etiología conocida y con una fuerte correlación hereditaria
- III) Diabetes tipo II (no dependiente de insulina) que se debe a un defecto secretor de insulina y resistencia a la misma
- IV) Diabetes Mellitus gestacional que es cualquier forma de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento en el embarazo

Sin embargo, la Diabetes se clasifica principalmente en sus dos tipos principales: Diabetes Mellitus de tipo I (IDDM) y Diabetes Mellitus de tipo II (NIDDM).

1.2.2. Complicaciones y patologías asociadas a la Diabetes Mellitus

Una de las mayores implicancias del estrés oxidativo y de la formación de AGE's son las complicaciones de la Diabetes. Es sabido que la hiperglucemia es un detonante del estrés oxidativo generando ER's y AGE's (como se mencionó anteriormente) y atenuando los mecanismos antioxidantes. Esta atenuación se da por la alteración de las enzimas antioxidantes como Px, CAT y SOD creando un estado de estrés oxidativo (Tessier y col., 1999; Brownlee y col., 2001). Por otro lado, la hiperglucemia ha sido asociada como el principal factor que contribuye a las enfermedades asociadas a la Diabetes Mellitus como la disfunción endotelial (Rodríguez-Mañas y col., 2003), nefropatía (Lee y col., 2003) y neuropatía (Vincent y col., 2004). Como mecanismo de las complicaciones se postula que la hiperglucemia conduciría a un estado de inflamación, a un aumento de ERO's (estrés oxidativo) y a la desregulación de caminos bioquímicos sensibles al estrés oxidativo como las vías c-JUN N-terminal quinasa (JNK), proteína quinasa C (PKC), p38-proteína quinasa activada por mitógenos (p38 MAPK) e inhibidor de la quinasa del factor de transcripción Kappa ($IKK\beta$). Estos eventos llevan a resistencia a la insulina, disfunción de las células β del páncreas y disfunción vascular, originando más hiperglucemia y la aparición de Diabetes tipo II.

Las complicaciones de la DM, inducidas por los radicales libres y el estrés oxidativo, incluyen la enfermedad coronaria, neuropatía, nefropatía, retinopatía (Phillips y col., 2004) y el accidente cerebrovascular (Asfandiyarova y col., 2007). El aumento en los niveles de glucosa e insulina junto con disfunción endotelial y dislipidemia en pacientes con Diabetes desarrolla trastornos macrovasculares como macroangiopatías que conducen a la aterosclerosis, pero también a trastornos microvasculares como neuropatía, nefropatía y retinopatía (Giugliano y col., 1995; Ceriello, 2006). Estas complicaciones son más tardías en comparación con las que se manifiestan a corto plazo como la hipoglucemia intracelular, la cetoacidosis y el coma hiperosmolar no cetónico (Wallace, 2004; Mohan, 2002). Ver tabla 2.

Infecciones Hipoglucemia intracelular Ceto-acidosis diabética Coma no cetónico Poliuria, polifagia, polidipsia Infarto de miocardio Hipertensión arterial Complicaciones en miembros inferiores	Ceguera- Retinopatía- Cataratas Neuropatía Aterosclerosis Enfermedad Periférica vascular Infecciones Enfermedad Cardiovascular Enfermedad Renal
--	---

Tabla 2. Complicaciones de la Diabetes asociadas al estrés oxidativo

1.2.3. Diabetes y Aterosclerosis

La aterosclerosis es una de las complicaciones de la Diabetes reconocida como un proceso inflamatorio crónico de las arterias con localización en la capa íntima, que conduce a la muerte del 80% de los pacientes diabéticos y está relacionada con la oxidación y glicosilación de proteínas y lípidos, como se describió anteriormente. Una de las proteínas involucradas es la lipoproteína de baja densidad (LDL), que es un agregado molecular esférico formado por proteínas (Apoproteína B) y fosfolípidos que transporta colesterol y triglicéridos a los tejidos. Esta proteína sufre doble alteración (de su parte proteica y de su parte lipídica) como consecuencia de la oxidación y glicosilación (Butterfield y col., 1998). Como consecuencia de este proceso la LDL oxidada se convierte en una molécula aterogénica que es fagocitada por macrófagos iniciando una respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo. Por otro lado, ocurre una disfunción de las células endoteliales que retienen a las Apo-B oxidadas (LDL, VLDL) en el espacio subendotelial. Como consecuencia, las células endoteliales se activan y expresan moléculas de adhesión como selectinas, VCAM-1 y quimiotáctinas (MCP-1) permitiendo la adherencia y migración de los monocitos, células dendríticas, linfocitos T reguladores (Treg) y linfocitos T colaboradores (Th-1). Sin embargo, una de las células que tienen mayor predominancia en estos procesos son los monocitos que se diferencian en macrófagos y expresan receptores que internalizan las Apo-B oxidadas. Esto crea células espumosas que contienen colesterol y triglicéridos. Durante los procesos de oxidación, los lípidos forman agregados insolubles por el entrecruzamiento oxidativo con los monómeros de Apo-B (Pham-Huy, 2008).

El estado de inflamación creado por los macrófagos incrementa la producción de citoquinas que producen más oxidación de Apo-B, activación del endotelio, más reclutamiento de macrófagos y más células espumosas. Todo esto da origen a la placa ateromatosa que termina por obliterar el flujo sanguíneo (Figura 1).

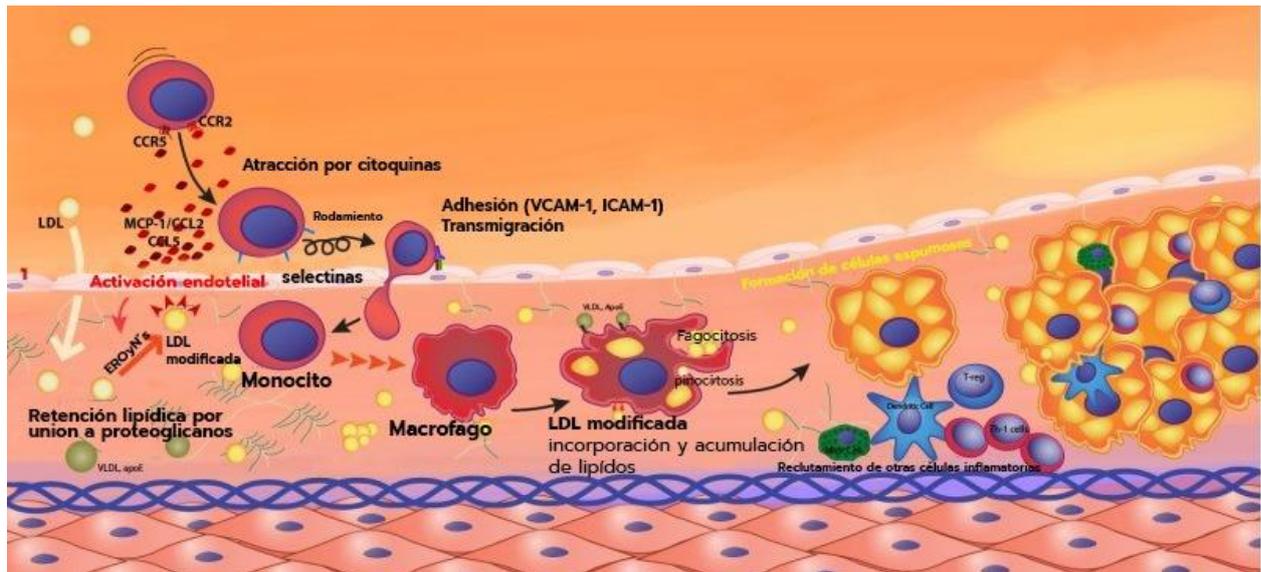


Figura 1. Rol de los Macrófagos y la LDL en la formación de la placa de ateroma.

Las proteínas HDL (lipoproteína de alta densidad), ApoA-1 y ApoE se oponen a este proceso inhibiendo la inflamación y el estrés oxidativo. Sin embargo, si este fenómeno continúa en el tiempo se produce la proliferación de las células del músculo liso de la túnica media del endotelio con aumento de la matriz extracelular que forma una barrera entre factores protrombóticos de las plaquetas y de las placas que se van formando. Posteriormente, se activan proteasas que degradan colágeno y se generan trombos que pueden viajar por la vasculatura dando origen a eventos isquémicos cardiovasculares. Queda así demostrada la participación de la LDL, de sus componentes (colesterol, triglicéridos, ApoB) y de los macrófagos en el proceso de formación del ateroma, del trombo y su participación en trastornos cardiovasculares (MacRae y col., 2015).

1.2.4. Alteración de las glándulas salivales

Entre los órganos sensibles al estrés oxidativo se encuentran las glándulas salivales, que pueden afectarse durante la Diabetes. Por ejemplo, es común que en la cavidad bucal se produzcan ERO's como el H_2O_2 , que es producido fundamentalmente por los microorganismos orales y también durante el metabolismo celular de las glándulas. En estas glándulas, el H_2O_2 se produce a través de la conversión del O_2^{*-} por acción de la SOD glandular (Geiszt y col., 2003). Sin embargo, estas ERO's en altas concentraciones son capaces de alterar el ciclo celular y la morfología de células del epitelio bucal humano, llevando a diferentes patologías como el cáncer, entre otras (Oda y col., 2001; Hänström y col., 1983). En el estado diabético se han reportado alteraciones estructurales y funcionales de las glándulas salivales (Komabayashi y col., 2000; Aren y col., 2003; Reznick y col., 2006). Komabayashi ha demostrado alteraciones funcionales en las glándulas parótidas durante la Diabetes Mellitus aguda inducida por la administración de estreptozotocina en ratas, alterándose el número de receptores beta. En estudios previos con este mismo modelo se reportó un aumento en la producción de H_2O_2 en las glándulas submandibulares relacionado con la disminución de la actividad y la expresión de la Px y un aumento en la actividad de la SOD. Esto se correlaciona con un aumento de la oxidación de proteínas y de la lipoperoxidación sin producirse cambios histológicos significativos (Turner y col., 2012).

Las glándulas salivales son órganos endocrinos y exocrinos que mantienen la salud bucal y sistémica a través de la secreción de enzimas antioxidantes (como las Px) que reducen al H_2O_2 al mismo tiempo que oxidan un compuesto presente en la cavidad bucal, el tiocianato (SCN^-). Este compuesto es oxidado formando el anión hipotiocianato ($OSCN^-$), el cual presenta acción antimicrobiana (Tenovuo y Larjava, 1987; Pruitt y col., 1983). Las peroxidasas también están involucradas en la regulación del metabolismo del ON (Takahama y col., 2003). Otras enzimas también participan de la eliminación de las ERO's como la SOD, la Glutación transferasa, la Glucuronil transferasa y la CAT. Si se afecta la funcionalidad de las glándulas durante la diabetes pueden aparecer otras enfermedades concomitantes como la enfermedad periodontal, infecciones bucales, alteración en la cicatrización de las mucosas y cáncer bucal, entre otras (Mata y col., 2004; Aitken-Saavedra y col., 2015).

1.2.5. Drogas antioxidantes para el tratamiento de la Diabetes

Ante la imposibilidad del organismo de contar con sistemas antioxidantes suficientes, en determinadas circunstancias, se hace necesario el hallazgo de sustancias inocuas que presenten esta actividad actuando a través de diferentes mecanismos.

Las drogas con actividad antioxidante podrían servir como coadyuvantes en el tratamiento de la Diabetes. En este sentido se ha visto que inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (estatinas) e inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (ACE) presentan efectos beneficiosos (pleiotrópicos) reduciendo la mortalidad en pacientes diabéticos como consecuencia de su efecto antioxidante, en relación con la disminución de la peroxidación lipídica, de la oxidación de proteínas y del aumento de las defensas inmunológicas (Nasri y Rafieian-Kopaei, 2013).

Por otro lado, drogas utilizadas específicamente para el tratamiento de la diabetes como hipoglucemiantes orales (glibenclamida) y los anti-hiperglucemiantes como la metformina presentan acción eliminadora de ERO's (Elmali y col., 2004; Ouslimani y col., 2005).

Existe en la actualidad una tendencia de buscar sustancia antioxidantes a partir de extractos vegetales, los cuales están sustituyendo la utilización de antioxidantes sintéticos, que han sido consumidos durante generaciones y que presentan en general menos efectos adversos que los compuestos de síntesis (Maestri y col., 2006), para utilizarlos como coadyuvantes en enfermedades que cursan con estrés oxidativo.

1.2.6. Plantas medicinales con actividad antioxidante y efectos antidiabéticos

Según la Organización Mundial de la Salud, el 80% de los habitantes del planeta cubren sus necesidades de atención primaria de salud con extractos elaborados a partir de plantas (Akerle, 1993; Ekor, 2013). Una explicación es que las plantas son una fuente importante de antioxidantes capaces de mitigar diferentes enfermedades. En este sentido, existen antecedentes de plantas y sustancias aisladas a partir de plantas que presentan actividad antioxidante primaria o secundaria impidiendo la formación y/o promoviendo la neutralización de EROyN's. Mas aún, se comprobó científicamente la actividad de extractos y principios activos obtenido a partir de plantas, sobre las enzimas detoxificadoras de ERO's en diversos tipos celulares como macrófagos y fibroblastos de gingiva, entre otros (Wang y col., 1999; Carbonaro y col., 2001). La actividad antioxidante de las plantas es atribuida a la presencia de compuestos como los ácidos cinámicos, diterpenos, flavonoides, cumarinas, lignanos, monoterpénos, fenilpropanoides, taninos y triterpenos (Larkins y col., 2004).

Numerosas plantas con actividad antidiabética presentan efectos antioxidantes siendo más eficaces e inocuas que los antioxidantes sintéticos (Rafieian-Kopaie y Nasri, 2012; Nasri y col, 2015). En ratas diabéticas inducidas experimentalmente, extractos de *Achillea santolina*, utilizada como hipoglucemiante es capaz de restaurar los niveles de enzimas antioxidantes CAT y SOD (Yazdanparast y col, 2007). Mas aún, compuestos aislados a partir de plantas, como el flavonoide Quercetina, presentan actividad protectora en Diabetes experimental disminuyendo el estrés oxidativo y preservando la integridad de las células β pancreáticas (Coskun y col., 2005).

Por ejemplo, un extracto acuoso de *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae), especie de *Larrea* que crece en el sur de Estados Unidos y México, es utilizada popularmente para el tratamiento de la diabetes (Winkelman, 1989). El compuesto mayoritario encontrado en esta especie es el ácido nordihidroguayaretico (NDGA) que presenta actividad anti-hiperglicémica en un modelo de diabetes en ratones (Jian y col., 1998).

En Argentina se encuentra ampliamente distribuida *Larrea divaricata* Cav. (Zygophyllaceae) que es una planta autóctona de América del Sur y que es utilizada en medicina popular fundamentalmente por sus propiedades antiinflamatorias (Del Vitto, 1997; Pedernera y col., 2006). La presencia de NDGA, compuesto conocido por su actividad antioxidante, fue descrita previamente en la planta (Mabry y col., 1977; Anesini y col., 2001).

El extracto acuoso (ExA) obtenido a partir de sus hojas posee actividad antitumoral, inmunomoduladora y antiinflamatoria reportada (Anesini y col., 1996; Davicino y col., 2010; Martino y col., 2014; Davicino y col., 2015; Martino y col., 2016) y antimicrobiana (Anesini y Pérez, 1993; Stege y col., 2006). ExA también demostró actividad antioxidante como actividad símil Px, símil CAT y símil SOD y actividad eliminadora de radicales libres en relación a la presencia del NDGA, que podría estar contribuyendo a la actividad del extracto además de otros compuestos (Turner y col., 2011). Mas aún, ExA presenta acción estimulante de la secreción de Px en glándulas submandibulares de ratas normales (Anesini y col., 2004). Otras actividades estudiadas, como la antiinflamatoria (Davicino y col., 2015) y la antiproliferativa en células de linfoma (Martino y col., 2016), no estarían relacionadas con la presencia de NDGA.

Sin embargo, los efectos de ExA sobre modelos de estrés oxidativo como el inducido por altas concentraciones de glucosa y modelos de hiperglucemia inducida por la administración de estreptozotocina (STZ), no fueron hasta el momento estudiados. Por otro lado, nada se conoce sobre la identidad de otros compuestos mayoritarios del extracto ni de la farmacocinética de ExA que asegure su uso por vía oral como medicamento herbario coadyuvante en patologías que cursan con estrés oxidativo.

1.3. *Larrea divaricata* Cav.

1.3.1. Características generales

Larrea divaricata Cavanilles es un arbusto que pertenece a la familia Zygophyllaceae y al género *Larrea*. Es conocida vulgarmente como: “jarilla”, “jarilla hembra”, “jarilla del cerro” o “jarilla de la sierra” (Bertotto, 1964; Ragonesse y col., 1984; Verettoni, 1985).

1.3.2. Descripción botánica.

El género *Larrea*, que debe su nombre a Don Juan Antonio Hernández de Larrea Deán de Zaragoza, constituye una distribución disjunta anfitropical, abarcando zonas semiáridas y desérticas de Amé-

INTRODUCCIÓN

rica, formando una flora autóctona de América del Norte y del Sur. Este género comprende 5 especies:

- 1) *L. ameghinoi* Speg. (jarilla de Chubut), la cual se encuentra en zonas áridas y bajas de la Patagonia Argentina, desde Neuquén hasta Chubut.
- 2) *L. cuneifolia* Cav. (jarilla macho), la cual habita zonas desérticas y semidesérticas, desde Chaco hasta Chubut.
- 3) *L. nítida* Cav., originaria de Chile.
- 4) *L. tridentata* (DC) Coville (gobernadora, chaparral), la cual sin duda es la más estudiada y se encuentra en los desiertos de América del Norte (Estados Unidos y México).
- 5) *L. divaricata* Cav., la cual es objeto de estudio en el presente trabajo de tesis, y merece consideración especial (Hunziker y col., 1969; Ragonesse y col., 1984).

Larrea divaricata Cavanilles es un arbusto de hasta 5 metros de altura. Sus hojas son subsésiles, hendidas hasta casi la base, con dos lóbulos lanceolados agudos, divergentes, mucronados y pubescentes, con dos estipulas rojizas cuya epidermis interna segrega resina. Presenta flores solitarias pseudoaxilares, con pedúnculos (5-7mm) pubescentes y con pétalos imbricados, amarillos, obovados, unguiculados. Los estambres son rojizos, desiguales y con escamas carnosas diversamente laciniadas. Las anteras son ovoideas, sub-vasifijas y sagitadas. Los ovarios son globosos, 5-carpelares, 5-loculares, con pubescencia rojiza, hirsuta y con estilo subulado. El fruto es una capsula de color amarillento-rojizo, hirsuta, que se separa en 5 mericarpios indehiscentes y las semillas son lisas (Cabrera, 1968; Soraru y Bandoni, 1978; Ragonesse, 1984; Verettoni, 1985).

La Figura 2 es una reproducción de Cabrera que resume las características botánicas de las distintas especies de *Larrea* y muestra un ejemplar de *Larrea divaricata* utilizado en la monografía.

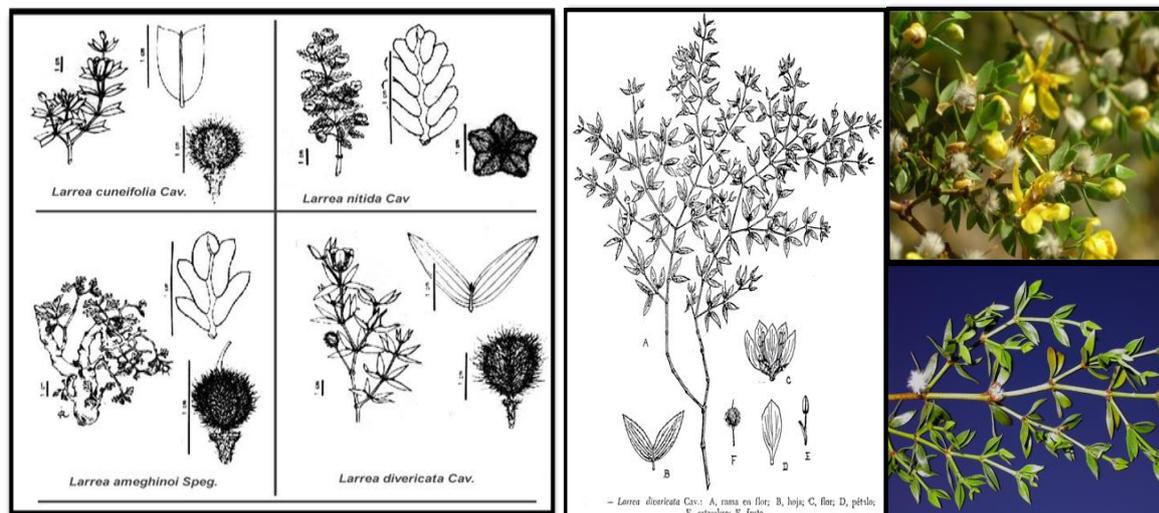


Figura 2. *Larrea divaricata* Cavanilles.

Reproducción de Cabrera (Flora de la Provincia de Buenos Aires, 1968). En esta figura se muestra rama en flor (A), hoja (B), flor (C), pétalo (D), estambre (E), y fruto (F). Se muestran además fotografías de la planta.

1.3.3. Distribución geográfica.

Esta planta es nativa de Chile, Bolivia, Perú y Argentina. Se la encuentra junto a otras jarillas fundamentalmente en la formación del monte occidental, en algunas zonas de la región espinal y de la provincia Chaqueña (Regiones fitogeográficas). En nuestro país se la puede encontrar en las provincias de Salta, Tucumán, La Rioja, Catamarca, Santiago del Estero, Córdoba, San Juan, San Luis, Mendoza, Río Negro, Neuquén, Chubut y el sur de Buenos Aires. Los jarillales se desarrollan en climas secos, con suelo arenoso o pedregoso-arenoso, pertenecientes a la región fitogeográfica del monte. Cubre bolsones, mesetas y laderas bajas de montañas. Las precipitaciones varían entre 80 y 250 mm anuales y la temperatura oscila entre 13-17 grados centígrados de promedio anual. La figura 3 describe la ubicación de las regiones fitogeográficas de la Argentina (Cabrera, 1976).

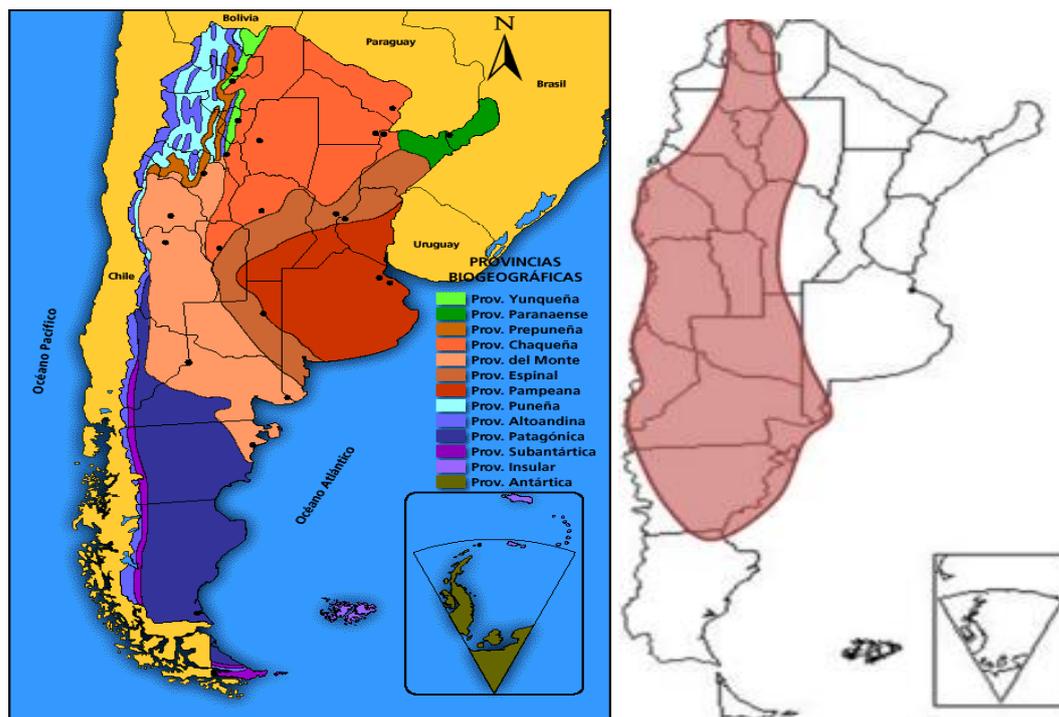


Figura 3. Zonas fitogeográficas y distribución de *L. divaricata* Cav. en la República Argentina



Figura 4. Ejemplares de *Larrea divaricata* en la Pcia. de Mendoza (camino a Las Cuevas)

1.3.4. Usos populares

Numerosos botánicos han relatado sus usos populares a través del tiempo:

- Hieronymus (1882): “antiinflamatoria, anticolérica, antiperiódica, emenagoga y sudorífica”.
- Murillo (1889): “excitante, balsámica y vulneraria”
- Bertotto (1964): “tiene propiedades astringentes, se emplea en cólicos abdominales acompañados de diarrea. De uso externo para inflamaciones hemorroidales, efectuando baños locales. Para la toma se preparan infusiones al 20 % y para uso externo la misma proporción, pero en cocimientos de 10 minutos.
- Soraru y Bandoni (1978): “las hojas son utilizadas como antiinflamatorias de uso externo, sudorífica, antimalárica, emenagoga, oxitócica, facilita partos y provoca abortos”
- Ratera y Ratera (1980): “tratamiento de bronquitis, desórdenes inflamatorios, reuma y tónico útil en fiebre.
- Ragonesse (1984): “Es utilizada para facilitar partos, provocar abortos y como antiinflamatorio de uso externo”
- Verettoni (1985): “Las hojas machacadas se emplean para aliviar inflamaciones y luxaciones. La infusión de sus hojas calma los dolores musculares. Cataplasmas de sus hojas curan afecciones reumáticas”.

Otros autores han reportado el uso de plantas del género *Larrea*, por indígenas norteamericanos, para el tratamiento de diversas afecciones como reumatismo, tuberculosis, cáncer, dolor crónico de espalda, infecciones urinarias y afecciones de la glándula prostática. Los indios Pima hervían las hojas de *Larrea tridentata* (Creosote bush) y usaban la decocción como emética y para los dolores (Dodge, 1968). Por otro lado, se reportó el uso de una infusión de la misma planta para el tratamiento de tumores, como melanomas malignos (Smart, 1968); así como de enfermedades venéreas y resfríos. También se ha reportado el uso de *Larrea nítida* para cataplasma y tumores (García-Alcover, 1950).

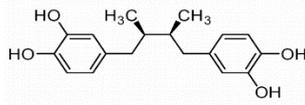
Por otro lado, las *Larreas* se utilizan como alimento para el ganado, ya que poseen un valor nutritivo semejante al de la alfalfa (Adams, 1970). En la Argentina todas las especies de *Larrea* se consideran con alto valor nutritivo para el ganado, debido a la presencia de proteínas digeribles y celulosa (Abiusso, 1971).

1.3.5. Estudios fitoquímicos previos

Numerosos estudios han contribuido a dilucidar los compuestos presentes en el género *Larrea*. El mismo se caracteriza por la presencia de un alto porcentaje de resinas en sus hojas. Entre otros, los componentes principales de la resina son: polifenoles (entre los que destacan lignanos y ácidos fenólicos), ceras, alcaloides y constituyentes volátiles como terpenos (Mabry y col., 1977).

Si bien algunos trabajos son referidos a la composición química de *L. divaricata*, la mayoría hacen referencia a *L. tridentata* mal denominada “*divaricata*” por algunos autores, en alusión a su nombre primitivo, ya que durante mucho tiempo se las consideró subespecies. Es por eso, que hay confusión en cuanto a la fitoquímica de *L. divaricata*, por lo que en el presente manuscrito se hará referencia solamente a la química del espécimen obtenido en Argentina.

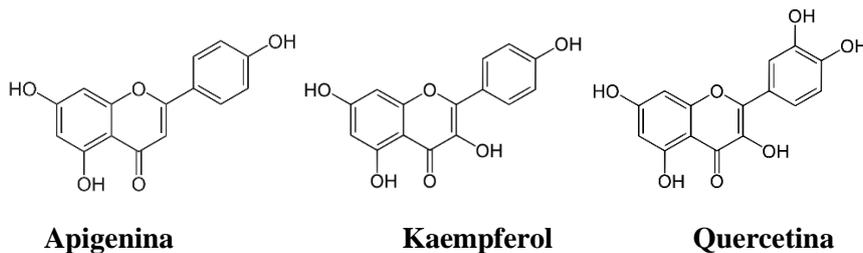
La resina externa de las hojas está compuesta de aproximadamente en un 50% de un lignano llamado ácido nordihidroguayarético (NDGA), característico del género *Larrea*, el cual sirve como marcador para caracterizar sus extractos. La cuantificación del NDGA y otros marcadores del extracto acuoso objeto de esta tesis se presenta más adelante, en resultados.



Ácido nordihidroguayaretico (NDGA)

El resto de los componentes son en su mayoría flavonoides aglicones, entre los que destacan **quercetina, kaempferol y apigenina**. Se han encontrado además derivados mono, di y tri-metilados de quercetina, mono y di-metilados de kaempferol y mono-metilados de apigenina y luteolina (Sakakibara y col., 1976). Más recientemente, se han identificado y aislado otros flavonoides a partir de extractos de hojas, por ejemplo, apigenina-7-metil éter a partir de un extracto clorofórmico (Vogt y col., 2013) y dos derivados di y tri- metilados del kaempferol (Rivero-Cruz y col., 2005). Otros compuestos también fueron aislados de las hojas: larragenina A, camesterol, stigmasterol y sitosterol (Habermehl y col., 1974), tres flavonoides O-glicosilados de quercetina, miricetina y un C-glicósido de apigenina (Timmermann y col., 1979). Más aún, Palacio y colaboradores han obtenido fenilpropanoides (ácido p-cumárico, ácido ferúlico y alcohol sinápico) a partir de cultivos de células de *L. divaricata* (Palacio y col., 2012).

Compuestos volátiles monoterpénicos se han detectado en todas las especies del género *Larrea*, como ser: limoneno, canfeno, borneol y alcanfor entre otros.



1.3.6. Estudios farmacológicos previos

Larrea divaricata es una planta con antecedentes científicos entre los que se reportan actividad antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante.

Efectos antitumorales: Se ha demostrado que ExA presenta actividad antiproliferativa sobre la línea de linfoma murino BW 5147, sin afectar la proliferación de linfocitos normales. Este efecto se relaciona con el aumento en los niveles de AMPc e inhibición de la activación de PKC (Anesini y col., 1996; Davicino y col., 2011). La actividad antiproliferativa sobre este tipo de células es una consecuencia del aumento en los niveles de H₂O₂ y de ON lo que lleva a las células a la apoptosis. El aumento en los niveles de H₂O₂ se relaciona, a su vez, con el aumento en la actividad SOD (Davicino y col., 2010). En esta actividad no involucra la presencia de NDGA (Anesini y col., 1999 y 2001).

Por otro lado, ExA presenta actividad antitumoral “in vivo” en tumores mamarios inducidos en ratas hembra por la administración de N- nitroso N- metil urea (NMU) (Anesini y col., 1997). Por su parte, Bongiovanni y col. (2008) demostraron que extractos metanólicos de las partes aéreas de la planta presentan actividad antiproliferativa sobre la línea tumoral MCF-7 (carcinoma mamario humano).

Efectos antimicrobianos: *L. divaricata* presenta actividad antiproliferativa sobre diferentes microorganismos, entre ellos: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* (Perez y Anesini, 1994). Stege y col.

INTRODUCCIÓN

(2006) demostraron que el extracto obtenido por infusión y decocción de las hojas de la planta presenta actividad antiproliferativa sobre cepas de *Helicobacter pylori* sensibles a claritromicina y resistentes al metronidazol. Por otro lado, se demostró la actividad antifúngica de extractos acuosos sobre *Saccharomyces cereviceae* (Davicino y col., 2007). El extracto etanólico también presenta actividad antimicrobiana sobre diferentes hongos como: *Lenzites elegans*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma applanatum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger* y *Trichorerma spp.*

Actividad antiinflamatoria: el extracto acuoso de esta planta (ExA) demostró actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación inducida por carragenina y 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) en ratones. Este efecto se ejerció a través de la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias y el aumento de citoquinas antiinflamatorias (Peralta y col., 2015). Por otro lado, Pedernera y col. (2006) determinaron la actividad antiinflamatoria de un extracto metanólico de *L. divaricata*.

Efectos inmunomoduladores: ExA presenta actividad tanto estimuladora como inhibidora de la activación de macrófagos dependiendo de la concentración. Ambos efectos son independientes de la presencia de NDGA (Davicino y col., 2006; Martino y col., 2010). En estudios “in vivo” realizados en ratones se demostró que ExA fue capaz de inducir la activación de macrófagos (Davicino y col., 2007). Además, se demostró “in vivo” que ExA provoca este efecto sobre los macrófagos en ratones con candidiasis, incrementando la producción de O_2^{*-} (Martino y col., 2011). Mas aún, una fracción obtenida a partir de ExA y libre de NDGA aumentó la activación de macrófagos a través de la producción de O_2^{*-} , aumento de proteínas citoplasmáticas (p47 phox), ON, H_2O_2 y aumento de la fagocitosis, en ratones infectados con *Candida albicans*. Estos efectos están relacionados con la translocación del factor de transcripción $NF\kappa\beta$ (Martino y col., 2014).

Efectos antioxidantes: Anesini y col. (2004) demostraron que ExA induce la secreción de Px en glándulas submandibulares de ratas a través de la activación de receptores β_1 adrenérgicos y que este efecto no se relaciona con la presencia de NDGA. Por otro lado, Turner y col. (2011) demostraron que ExA presenta actividad similar a CAT, Px y SOD, así como actividad eliminadora del radical DPPH e inhibición de la peroxidación lipídica.

Inducción del crecimiento capilar: ExA estimula el crecimiento capilar en ratones, en asociación con un extracto acuoso de *Coffea arabica* (café) (Davicino, Alonso, Anesini, 2010)

Estudios de toxicidad aguda: ExA demostró ser inocuo de acuerdo a los estudios de toxicidad aguda realizados en ratones, ya que su DL_{50} (dosis letal media) fue de 4000 mg/kg (3030-5276) para las hembras y de 10.000 mg/kg (8196-12200) (Anesini y col, 1997).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

2.1. Hipótesis

Extractos de plantas con amplia distribución y uso medicinal en la Argentina, como *L. divaricata*, constituyen una potencial fuente de obtención de principios activos antioxidantes capaces de modular los niveles de EROyN's y las enzimas relacionadas a su metabolismo, con una potencial aplicación como coadyuvantes en la terapéutica de patologías que cursan con estrés oxidativo como la diabetes.

2.2. Objetivo general

Teniendo en cuenta que la glucosa es un inductor de estrés oxidativo y que el extracto acuoso de *L. divaricata* presenta antecedentes de actividad antioxidante, se propuso estudiar el mecanismo de la acción antioxidante "in vitro" en órganos como glándulas submandibulares de ratas tratadas con estreptozotocina, en células del sistema inmune como los macrófagos y en las lipoproteínas plasmáticas HDL y LDL en presencia de altas concentraciones de glucosa e "in vivo" en un modelo de ratones tratados con estreptozotocina y la participación de su compuesto mayoritario (NDGA) en dicha acción. Se planteó también estudiar la composición fitoquímica de ExA y su perfil farmacocinético a través del seguimiento de su compuesto mayoritario NDGA.

2.3. Objetivos específicos

A. Estudios fitoquímicos

- Identificar y cuantificar NDGA por HPLC
- Cuantificar polifenoles totales
- Cuantificar flavonoides totales
- Identificar por HPLC compuestos flavonoides presentes en el extracto

B. Estudios farmacológicos: Determinación de la actividad antioxidante de ExA

B.1. Evaluación de la actividad antioxidante general "in vitro"

- Determinar la capacidad de eliminación de radicales libres, inhibición de la peroxidación de fosfolípidos entre otras.

B.2. Estudio de la actividad antioxidante "in vitro" en glándulas submandibulares de animales normales y tratados con estreptozotocina.

- Estudiar el efecto de ExA y NDGA sobre la producción de especies reactivas del oxígeno: H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y del nitrógeno: ON.
- Estudiar el efecto del extracto y del NDGA sobre la oxidación de proteínas y fosfolípidos de membrana.
- Estudiar el efecto de ExA y del NDGA sobre la expresión y actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de ERO's como: CAT, SOD y Px.
- Estudiar el efecto de ExA y del NDGA sobre la expresión de enzimas involucradas en la formación de especies reactivas del nitrógeno: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

B.3. Estudio de la actividad antioxidante “in vitro” en macrófagos cultivados en presencia de glucosa.

- Estudiar el efecto de ExA y del NDGA sobre la proliferación, la viabilidad, la producción de EROyN's, especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la citotoxicidad en macrófagos en presencia de altas concentraciones de glucosa.

B.4. Estudio de la actividad antioxidante en proteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL)

Estudiar el efecto de ExA y NDGA sobre:

- La función antioxidante de HDL ante estrés oxidativo y nitrosativo inducido.
- La estructura de HDL ante estrés nitrosativo inducido por 3-morphosydnonimine-N-ethylcarbamide (SIN-1)
- La oxidación de LDL inducida por Cu^{++}

B.5. Estudio de la actividad antioxidante “in vivo” en ratones tratados con estreptozotocina

- Determinar la toxicidad sub-crónica del extracto de *Larrea divaricata* y del NDGA en ratones normales.
- Evaluar en sangre parámetros de oxidación como los niveles de malondialdehído y glutatión reducido y evaluar el perfil lipídico.
- Determinar el efecto sobre la glucemia del extracto luego de su administración por vía intraperitoneal (i.p.) y oral.
- Evaluar las diferencias histológicas derivadas de los distintos tratamientos y controles.

C. Estudios farmacocinéticos

- Estudiar la estabilidad del extracto en medio gástrico e intestinal simulado, a través del estudio del NDGA y de su actividad antioxidante.
- Determinar el perfil plasmático del extracto y/o los compuestos mayoritarios (NDGA y otros) en ratas sanas, a fin de determinar el modelo farmacocinético que mejor ajusta y calcular las constantes farmacocinéticas resultantes.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Droga Vegetal

Las hojas de *Larrea divaricata* Cav. utilizadas en este estudio fueron recolectadas en la pedanía del Río Dolores, Barrio Aguas Azules (Sector B), localidad de Capilla del Monte, Departamento de Puni-lla, Provincia de Córdoba, Argentina (nomenclatura catastral: Dep. 23- Ped. 01- Pueblo 06- Circ. 05- Secc. 02- Manzana 054- Parcela 003) e identificados mediante análisis morfológicos, anatómicos e histoquímicos por el Dr. Gustavo Giberti †, del Museo de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Se conservo un ejemplar (BAFC n. 38) en el Museo de Farmacobotánica.

3.1.2. Obtención del extracto acuoso de *L. divaricata* (ExA).

Las hojas (75 g) de *L. divaricata* Cav. previamente desecadas al aire fueron sometidas a la acción del agua (1000 ml) a ebullición durante 10 min. La extracción fue mantenida a 56°C con agitación en un baño termostático por un lapso de 45 min. Luego de una maceración a 5°C por 72 h, el extracto fue filtrado, liofilizado y almacenado en un lugar frío y seco hasta el momento de su uso (Davicino y col., 2010). Se obtuvo un rendimiento del 19%.

3.1.3. Cultivo de Macrófagos de línea celular

La línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 de la colección de cultivos de tipo americano (ATCC) (5×10^5 células/ml) se cultivó en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, conteniendo antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin) y se mantuvo en un incubador humidificado al 5% de CO₂ y 37°C.

3.1.4. Uso de Animales de Laboratorio

Todos los experimentos realizados con animales de laboratorio fueron diseñados acorde a los principios establecidos por *Guide for the care and use of laboratory animals* (U.S. National Research Council, 1996). Las técnicas utilizadas para el punto final humanitario se basaron en las *Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 1 y 2* (Comisión Europea, 1995). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de experimentación con animales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Nro 220612-1.

3.2. Métodos

3.2.1. Estudios Fitoquímicos de ExA.

3.2.1.1. Identificación y cuantificación de NDGA y Rutina por HPLC

Para la valoración de NDGA por HPLC se utilizó un equipo Varian ProStar equipado con un inyector Rheodyne (20 µl), horno a temperatura ambiente y detector de arreglo de diodos a 280 nm.

Fase estacionaria: Columna de fase reversa Phenomenex, modelo Kinetex 5 µm XB- C18 100Å (250 mm x 4.6 mm). Serie: H16-121960

Fase móvil: A: agua: ácido acético (98:2), B: Metanol: ácido acético (98:2), se realiza un gradiente: Se parte de 15 % B a 40 % B en 30 min; 40 % B a 75 % B en 10 min; 75 % B a 85 % B en 5 min y

100 % B en 5 min. Mantener 100% de fase móvil B por 10 minutos antes de volver a las condiciones iniciales. Flujo: 1.2 ml/min.

Las muestras fueron valoradas frente a estándar Sigma (Sigma, USA) comparando las áreas de los picos obtenidos en cada caso. (Davicino, Alonso, Anesini, 2011)

El mismo método fue utilizado para la determinación de Rutina, pero en este caso se utilizó una diferente longitud de onda en el detector: 255 nm. Las muestras fueron valoradas frente a estándar de Rutina (Sigma, EE.UU.) comparando las áreas de los picos obtenidos en cada caso (Filip 2003).

Validación del método: El método cromatográfico debe cumplir con los requisitos: de selectividad, linealidad, exactitud y/o recuperación, precisión inter e intraensayo, límite de cuantificación y de detección (Farmacopea Argentina 7^{ma} Ed, 2003; Quattrocchi, Abelaira y Laba, 1992). Para ello se realizó una curva de calibración 0,8 a 80 µg/ml para NDGA.

3.2.1.2. Identificación de otros compuestos presentes en ExA por HPLC

3.2.1.2.1. Método 1: INTI

Una muestra de ExA fue enviada al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas del Centro de Química del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) a cargo de la Ing. Qca. Cecilia Alberti, donde se desarrolló un método cromatográfico para la identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos a través de la determinación de iones cuasimoleculares y la fragmentación de los mismos. Se utilizó un sistema HPLC Waters Alliance acoplado a un Espectrómetro de masa Quattro Premier XE marca Waters y se utilizó ionización por electrospray en modo negativo (ESI-).

Se desarrolló un método cromatográfico con gradiente compatible con el detector de masa

Fase móvil: 0,1% Acido fórmico en agua, 0,1 Acido fórmico en Acetonitrilo

Columna ACE 3 C18 (50 x 2,1) mm

La identificación de los compuestos de interés se realizó teniendo en cuenta la masa molecular de los iones cuasimoleculares (fragmentaciones) e información hallada en bibliografía por el INTI.

3.2.1.2.2. Método 2: CIDEC- FFyB

Otra muestra de ExA fue enviada al CIDEC (Centro de Investigación, Desarrollo y Control Farmacéutico) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires donde se utilizó un equipo HPLC-MS/MS UltiMate 3000 HPLC acoplado a un espectrómetro de masa TSQ Quantum Access MAX Triple Cuádruplo con una fuente de ionización ESI (Massachusetts, EE.UU.).

Las condiciones de calibración fueron las siguientes: voltaje de spray 3.5 kV, temperatura de vaporizador 233°C, temperatura de capilar 314°C, presión de gas envolvente y gas auxiliar se fijaron en 10 y 45 unidades, respectivamente. El método consistió en dos eventos, single ion monitoring (SIM) y selective reaction monitoring (SRM). Se trabajó en modo positivo para los glicósidos de flavonoles y en modo negativo para los ácidos fenólicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Método HPLC: Columna: Hypersil C18; 150 x 4.6 mm (5 µm). Flujo: 1 ml/min

Se desarrolló un gradiente con A: ácido fórmico 0.1% aq. Y B: ácido fórmico 0.1% en metanol

Soluciones testigo mixtas:

Modo positivo: se partió de una solución stock de 1 mg/ml en metanol de los siguientes compuestos: quercetina, catequina, epicatequina, procianidina B2, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido y quercetina-3-O-arabinofuranósido. Luego, se tomó una alícuota de cada una de estas soluciones y se realizó una dilución a una concentración final de 100 ng/ml utilizando ácido fórmico 0.1% como diluyente.

Modo negativo: se partió de soluciones stock de 1 mg/ml en metanol de ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido nordihidroguayarático. Posteriormente, se tomó una alícuota de cada una de ellas y se diluyó en ácido fórmico 0.1% hasta una concentración final de 100 ng/ml.

Solución muestra: Se pesaron exactamente de 10,00 mg de extracto seco, se agregó una alícuota de una mezcla metanol:agua (70:30) y se sonó durante 10 minutos. Se procedió a centrifugar y se realizó una dilución al medio en ácido fórmico 0.1%.

La identificación de los compuestos de interés se realizó teniendo en cuenta la masa molecular, fragmentos diagnósticos y coincidencia de tiempo de retención con los testigos utilizados.

3.2.1.3. Determinación de polifenoles totales.

El contenido total de polifenoles se determinó mediante espectrofotometría a través del método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar. El extracto liofilizado se pesó y se disolvió en agua destilada. Brevemente, 1,0 ml del extracto se transfirió a tubos separados que contenían 7,0 ml de agua destilada, 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,5 ml de una solución anhidra de carbonato de sodio al 20%. Los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-vis a 765 nm. La concentración de polifenoles en las muestras se interpoló de una curva estándar de ácido gálico (SIGMA, EE.UU.) que osciló entre 10 y 50 µg / ml (coeficiente de correlación de Pearson: $r^2 = 0.9996$).

3.2.1.4. Determinación de flavonoides totales.

La determinación de los flavonoides totales de ExA se realizó según la técnica descrita por Mammen (Mammen y col., 2012). Para ello, a 10 mg del extracto se le agregó $AlCl_3$ y acetato de potasio y se incubó por 30 min. Al cabo de ese tiempo, se midió la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresaron como µg de flavonoides/mg de extracto, mediante la confección de una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de quercitrina (Sigma, EE.UU.).

3.2.1.5. Composición Nutricional y Mineral

Estas determinaciones fueron realizadas sobre ExA por el Dr. Néstor Pellegrino en la Catedra de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Se adoptaron los métodos recomendados por AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2000) para determinar los niveles de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y fibra dietaria total. El contenido de humedad se determinó calentando 5,0 g de ExA en un crisol colocado en un horno mantenido a 70 °C bajo presión (50 mm Hg). La cuantificación de cenizas se determinó mediante calcina-

ción de 3.0 g de ExA en un horno mufla mantenido a 550 ° C hasta peso constante. Los niveles de proteína (% de nitrógeno total x 6.25) se determinó mediante el método de Kjeldahl utilizando 1,0 g de muestra y el contenido lipídico se determinó gravimétricamente después de la extracción con éter de petróleo (rango de punto de ebullición 35–65 ° C) de muestras de 5.0 g. La fibra dietaria total se determinó mediante el método enzimático-gravimétrico descrito por Prosky y col. (1988). El contenido total de carbohidratos se calculó como el residuo, excluyendo proteínas, lípidos, fibra dietaria total y cenizas, de la siguiente manera: carbohidratos totales = 100 - (% de humedad +% de cenizas +% de proteínas +% de lípidos +% de fibra dietaria total).

Para determinar la composición mineral, muestras de 1,0 g de ExA se digirieron en 15 ml de HNO₃/ HClO₄ (2:1, v/v) a 140 °C. Luego, los minerales de sodio, potasio, calcio, magnesio, cobre, hierro y zinc se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica en un instrumento Perkin-Elmer modelo AAnalyst400

3.2.2. Ensayos de actividad antioxidante general de ExA y NDGA

3.2.2.1. Calculo de la concentración efectiva media (CE₅₀)

La actividad antioxidante expresada como concentración efectiva media (CE₅₀) se calculó con la siguiente fórmula (Alexander y col., 1999).

$$CE_{50} = \text{Antilog } D - \{[(A - 50 \% \text{ respuesta máxima}) X] / Y\}$$

Donde: A: valor inmediato superior al 50 % de la respuesta máxima

B: valor inmediato inferior al 50 % de la respuesta máxima

D: log concentración correspondiente a la respuesta A

C: log concentración correspondiente a la respuesta B

X: D – C y Y: A – B

3.2.2.2. Actividad Eliminadora de radicales libres (Scavenger de DPPH)

La actividad antioxidante medida a través de la capacidad eliminadora del radical libre difenil picrilhidrazilo (DPPH) se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Blois (1958).

Preparación de las soluciones Muestra: ExA fue diluido en agua MiliQ, de forma de obtener soluciones con las siguientes concentraciones finales en el tubo de reacción: 0,1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml. Se prepararon blancos de muestra utilizando agua MilliQ. El NDGA estándar de referencia fue diluido primero en etanol y luego en agua para obtener las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 5; 10 µg/ml. Soluciones de referencia: Se utilizó vitamina C como estándar de referencia antioxidante. Se prepararon soluciones acuosas de 1000 µg/ml en el tubo de reacción.

Procedimiento: Se tomaron 100 µl de cada solución muestra y se colocaron en un vial. Se añadieron 400 µl de buffer Tris-clorhídrico 100 mM y 500 µl de una solución de DPPH 500 µM en etanol absoluto. Se incubó en oscuridad durante 20 minutos y se leyó la absorbancia a 517 nm. Se realizó un control de DPPH preparado con buffer Tris-clorhídrico 100 mM.

MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad antioxidante se determinó mediante la comparación de la absorbancia obtenida con las soluciones de referencia o las soluciones muestra con la obtenida con el control de DPPH. Los resultados se expresaron como % respecto al control, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Act. eliminadora de radicales DPPH: } [(Abs. muestra - Abs. control) / Abs control] \times 100.$$

3.2.2.3. Inhibición de la lipoperoxidación

3.2.2.3.1. Determinación de TBARS del ácido linoleico.

La actividad inhibidora de la peroxidación lipídica se determinó de acuerdo con el método de Osawa y Namiki (1981), modificado por Sanchez-Moreno y col. (1998). Este método se basa en determinar la capacidad de las muestras para inhibir la peroxidación lipídica del ácido linoleico. Este ácido se oxida originando peróxidos que a su vez reaccionan con el cloruro ferroso, oxidándolo. El hierro oxidado como Fe^{3+} reacciona con el tiocianato de amonio dando tiocianato férrico, de color rojizo, que absorbe a 500 nm. Una disminución en la absorbancia es indicativa de actividad antioxidante.

Preparación de las soluciones Muestra: ExA fue diluido en agua MiliQ, de forma de obtener soluciones con las siguientes concentraciones finales en el tubo de reacción: 0,1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$. Se prepararon blancos de muestra utilizando agua MiliQ. El NDGA estándar de referencia fue diluido primero en etanol y luego en agua para obtener las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 5; 10 $\mu\text{g/ml}$.

Solución de referencia: Se utilizó una solución acuosa de vitamina C, estándar de referencia antioxidante, de manera de obtener una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ en el tubo de reacción.

Procedimiento: Se colocaron 1600 μl de cada solución muestra o solución de referencia antioxidante en un tubo de vidrio y se agregaron 3200 μl de *buffer* fosfato pH 7, 1600 μl de agua ultra pura y 1600 μl de ácido linoleico (2,5 % en etanol absoluto). Se incubó en un baño termostático a 37 ° C durante 4 días. Se tomaron muestras de 50 μl de cada tubo a diferentes tiempos y se hicieron reaccionar con 50 μl de tiocianato de amonio (30 %) y 50 μl de cloruro ferroso (0,02 M) en presencia de etanol al 75 %. Se incubaron durante 3 minutos en oscuridad y se determinó la absorbancia a 500 nm. Se realizó un control con *buffer* fosfato pH: 7.

La actividad antioxidante se determinó por comparación entre la absorbancia obtenida con las soluciones muestra o solución de referencia antioxidante y la obtenida con el control de máxima oxidación del ácido linoleico (96 horas de incubación en baño termostático a 37°C). Se calculó la actividad antioxidante con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la peroxidación lipídica: } [Abs muestra - Abs control] / Abs control \times 100.$$

3.2.2.3.2. Determinación de TBARS de yema de huevo.

La actividad antioxidante se determinó en un modelo de peroxidación de fosfolípidos en yema de huevo (Kuppusamy et al. 2002). El extracto o el NDGA en diferentes concentraciones (ExA:100, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$; NDGA: 0,3, 1,5, 3, 4,5, 6,0 $\mu\text{g/ml}$) se mezclaron con 1 ml de yema de huevo emulsionado en *buffer* fosfato 0,1 M (pH 7,4) para obtener una concentración final de 25 g/l. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora y luego se trató con 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 15%

MATERIALES Y MÉTODOS

recién preparado y 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico al 1% (TBA). Los tubos de reacción se mantuvieron en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Después de enfriar, los tubos se centrifugaron a 3500 x g durante 10 minutos para eliminar la proteína precipitada. La formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se midió a 532 nm. El control de la oxidación consistió en yema de huevo y buffer fosfato. El blanco de extracto se preparó sin yema de huevo. Los valores del blanco se restaron de cada tubo de ensayo. Se utilizó butilhidroxitolueno (BHT) (1000 µg /ml) como compuesto antioxidante de referencia. El porcentaje de inhibición de la peroxidación se calculó con la siguiente ecuación: % de inhibición: $[(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$, donde A_0 era el control de la absorbancia de la oxidación y A_s era la absorbancia de la muestra.

3.2.2.4. Interferencia con metales (Poder reductor)

La determinación del poder reductor se realizó según la técnica descrita por Ferreira y col (2007). La técnica se fundamenta en la reacción del ferricianuro de potasio con el extracto o NDGA que al tener capacidad reductora reduce el hierro III a hierro II formando hexaciano ferrato II de potasio el que a su vez reacciona con cloruro férrico para dar un complejo que absorbe a 700 nm, es decir a mayor poder reductor mayor absorbancia. Se realizó una curva de calibración con ácido ascórbico estándar de referencia (SIGMA, EE.UU.) en concentraciones de 2,5 a 80 µg/ml en agua.

En un tubo de ensayo se colocaron 2,5 ml de muestra o solución de referencia y se agregaron 2,5 ml de agua, 2,5 ml de buffer fosfato (pH 6,6; 0,2 M) y 2,5 ml de ferricianuro de potasio (10 mg/ml) y se incubaron a 50°C durante 20 minutos. Luego los tubos se retiraron del baño termostatizado y se colocaron inmediatamente en un baño de hielo. Se agregaron 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. 2,5 ml del sobrenadante se transfirieron a otro tubo y se agregaron 2,5 ml de agua destilada y 0,5 ml de tricloruro férrico al 0,1%. Se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 700 nm. El blanco de muestra se realizó con agua destilada. El poder reductor se expresa como equivalente a tal concentración de ácido ascórbico, interpolando en la curva de calibración.

3.2.2.5. Inhibición de la formación de AGE's.

Para determinar la formación de AGE's, los huevos se sometieron a un método de cocción estándar, fritura. En resumen, 2,5 ml de huevos homogeneizados más 2,5 ml de agua (control oxidativo positivo) y 2,5 ml de huevos homogeneizados más 2,5 ml de ExA (0,1, 1,0, 10 mg/ml) o 2,5 ml de NDGA (3 µg/ml) fueron freídos con 1 ml de aceite durante 5 minutos a 70°C. Las muestras, obtenidas mediante este proceso, se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Para determinar los AGE's totales, se homogeneizó 1 g de cada muestra en 2 ml de PBS, se centrifugó durante 5 min a 900 x g y se usó el sobrenadante para la cuantificación. Los AGE's se determinaron mediante un kit de inmunoensayo competitivo indirecto (LAMIDER, Laboratorio Mexicano de Inmunoensayo y Diagnóstico de Referencia S.A. de C.V.) y se calcularon por interpolación en una curva de calibración realizada con el AGE proporcionado por el fabricante.

3.2.2.6. Actividad símil enzimas antioxidantes (SOD, CAT, Px)

Con esta metodología se evaluó la capacidad de ExA y NDGA de simular la actividad del sistema antioxidante enzimático conformado por SOD, CAT y Px. Este sistema es el responsable de la ruta de detoxificación del anión superóxido y del peróxido de hidrogeno originados durante el metabolismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinó la actividad símil enzimática de diferentes concentraciones de ExA y NDGA a través de diferentes técnicas que permitieron evaluar la capacidad de catalizar la desaparición de los productos oxidantes derivados de las rutas metabólicas.

Preparación de las soluciones Muestra: ExA fue diluidos en agua MiliQ, de forma de obtener soluciones con las siguientes concentraciones finales en el tubo de reacción: 0,1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$. Se prepararon blancos de muestra utilizando agua MiliQ. El NDGA estándar de referencia fue diluido primero en etanol y luego en agua para obtener las siguientes concentraciones en el tubo de reacción: 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 5; 10 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.2.6.1. Actividad símil catalasa

La determinación de la actividad símil CAT se realizó de acuerdo con el método descrito por Carrillo y col. (1991). Este método evalúa la capacidad de un extracto o un compuesto de descomponer el H_2O_2 en O_2 y H_2O . El H_2O_2 absorbe a 240 nm, por lo tanto, una disminución en la absorbancia indica la capacidad eliminadora del H_2O_2 .

Procedimiento: Se colocaron 100 μl de las soluciones muestra en el tubo de reacción a los cuales se añadieron 2850 μl de buffer fosfato 50 mM pH 7. Se homogeneizó con ayuda de un agitador a vibración y se trasvasó cuantitativamente a una cubeta para lectura espectrofotométrica. Inmediatamente antes de comenzar la lectura se añadieron 50 μl de H_2O_2 0,35 M para poder observar la variación de la absorbancia en forma cinética.

La actividad catalasa se determinó en forma cinética, midiendo el cambio en la absorbancia por minuto ($\Delta \text{Abs/min}$) a 240 nm durante 5 minutos.

Con el $\Delta \text{Abs/min}$ promedio (velocidad promedio) de la muestra determinado en la porción lineal de la curva se calculó la concentración de H_2O_2 degradado por minuto teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar a 25°C y $\text{pH}=7$ del H_2O_2 ($0,0394 \mu\text{M/min/cm}^2$) (Nelson y Kiesow, 1972). Una vez calculada la concentración de H_2O_2 degradado por minuto se calculó la actividad catalasa sabiendo que 1 unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1 μmol de H_2O_2 .

3.2.2.6.2. Actividad símil peroxidasa

La determinación de la actividad símil Px se realizó según el método descrito por Herzog y Fahimi (1973). Este método evalúa la capacidad de un extracto o compuesto de reducir al H_2O_2 a agua, y oxidar al mismo tiempo a la sustancia 3,3'-diaminobencidina (DAB). La DAB se oxida originando un compuesto de color marrón que puede ser determinado espectrofotométricamente a 465 nm. Por lo tanto, la absorbancia es directamente proporcional a la actividad símil Peroxidasa.

Preparación de la solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB): Se preparó una solución extemporánea de concentración 5×10^{-4} en buffer Krebs-Henseleit (pH 7,4).

Solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2): Se preparó una solución acuosa extemporánea de H_2O_2 a partir de H_2O_2 30 volúmenes haciendo una dilución 1/86.

Soluciones de referencia: Se prepararon soluciones de peroxidasa de rábano picante en concentraciones conocidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento: Se colocaron 100 μl de cada solución muestra o solución de referencia en el tubo de reacción. Se añadieron 875 μl de solución de DAB y 25 μl de solución de H_2O_2 . Se determinó el cambio en la absorbancia por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) a partir del agregado del peróxido de hidrógeno a 465 nm a intervalos de 30 segundos por un lapso de 5 minutos. Para calcular la actividad peroxidasa se determinó el $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ promedio (velocidad promedio) de la muestra en la porción lineal de la curva obtenida y se interpoló en la curva de calibración obtenida con el estándar de referencia ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$ en función de la concentración de enzima).

3.2.2.6.3. Actividad símil superóxido dismutasa

La determinación de la actividad símil SOD se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Carillo y col. (1991). Este método se basa en la capacidad de un extracto o un compuesto de inhibir la oxidación espontánea de la adrenalina a adenocromo, a través de la reducción del oxígeno. La adrenalina se autooxida a pH 10,7 y forma un compuesto llamado adenocromo de color rosado-rojizo que presenta absorción a 480 nm.

Procedimiento: Se colocaron 50 μl de las soluciones muestra en el tubo de reacción, se adicionaron 910 μl de buffer fosfato 0,05 M, pH 10,7 (48,32 ml PO_4HNa_2 0,05 M + 1,68 ml NaOH 0,05 M), y en el momento de comenzar la reacción se agregaron 40 μl de adrenalina 2 mM. Luego del agregado de la adrenalina, se midió la formación del adenocromo espectroscópicamente a 480 nm en forma cinética durante 5 minutos (cada 10 segundos).

Se realizó un control de auto-oxidación de la adrenalina preparado con 960 μl del buffer fosfato 0,05 M, pH 10,7 y 40 μl de adrenalina.

La actividad SOD se calculó determinando el $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ promedio (velocidad promedio) de la muestra obtenido en la porción lineal de la curva y el $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ promedio (velocidad promedio) de la adrenalina (control de auto-oxidación). Luego se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación de la adrenalina según la siguiente ecuación: % de Inhibición = $[\Delta\text{Abs}/\text{min}$ adrenalina (control de auto-oxidación) - $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ muestra] / $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ adrenalina (control de auto-oxidación) x 100

La actividad SOD se calculó teniendo en cuenta que 1 U SOD inhibe la auto-oxidación de la adrenalina en un 50 %.

3.2.2.7. Activación de enzimas antioxidantes

3.2.2.7.1. Velocidad máxima de eliminación de H_2O_2 de la peroxidasa estándar pura

La actividad Px fue determinada por el método de Herzog y Fahimi (1973), descrito anteriormente, usando por un lado: una actividad establecida de la enzima (3mU/ml) y de ExA (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o NDGA (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) frente a concentraciones variables de H_2O_2 (0,0-3,0mM) y por el otro: actividades variables de la enzima (0,025-7,80 mU/ml) y las mismas concentraciones de ExA o NDGA.

3.2.2.7.2. Velocidad máxima inhibición de la oxidación de la adrenalina de la SOD estándar pura.

La actividad SOD se determinó por el método de Carillo y col. (1991), descrito anteriormente, usando por un lado: una actividad establecida de la enzima (0,5mU/ml) y de ExA (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o

MATERIALES Y MÉTODOS

NDGA (1,5µg/ml) frente a concentraciones variables de adrenalina (0,0-10 mM) y por el otro: actividades variables de la enzima (0,1-1,67 mU/ml) y las mismas concentraciones de ExA o NDGA.

3.2.2.7.3. Velocidad máxima de eliminación del H₂O₂ de la CAT estándar pura

La actividad CAT se determinó por el método de Carillo y col. (1991), descrito anteriormente, usando por un lado: una actividad establecida de la enzima (4 U/ml) y de ExA (500µg/ml) o NDGA (1,5µg/ml) frente a concentraciones variables de H₂O₂ (0,0-17,5mM) y por el otro: actividades variables de la enzima (0,42-4,0 U/ml) y las mismas concentraciones de ExA o NDGA.

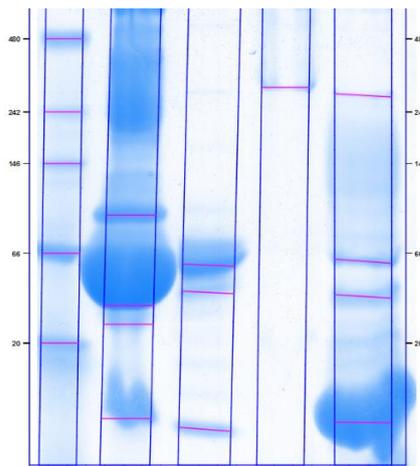
3.2.2.8. Actividad protectora de lipoproteínas plasmáticas

3.2.2.8.1. Preparación de plasma y lipoproteínas.

Se obtuvo sangre de ocho voluntarios sanos y normolipidémicos por punción venosa y se recolectó en tubos de sistema de vacío con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (5 mmol/L). La sangre se centrifugó a 800 g, a 4°C durante 15 minutos y se empleó el plasma separado para aislar HDL y LDL como se indica a continuación. Se obtuvo el consentimiento informado de los voluntarios y las investigaciones se realizaron de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki. Estos ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Glicación, Oxidación y Enfermedades (Glycation, Oxidation and Disease, Touro University of California) de la Universidad de Touro, California, EE.UU.

3.2.2.8.2. Aislamiento LDL y HDL humana

La LDL (d =1,019-1,063 g / ml) y HDL (d = 1,063-1,210 g / ml) se obtuvieron a partir de plasma mediante ultracentrifugación secuencial por flotación a 15°C (Gugliucci, 1996). Después de una extensa diálisis, tanto HDL como LDL se mantuvieron en 10 mmol/L de buffer fosfato de sodio, pH 7,4 que contenía 150 mmol/L de NaCl, 0,1 mmol/L de EDTA a 4°C y se usaron en 1 semana. Antes de los experimentos de oxidación, las lipoproteínas se dializaron durante la noche contra el mismo buffer sin EDTA. Luego se realizó una electroforesis y los geles fueron teñidos con Commasie blue para determinar la pureza de cada fracción (Figura 5).



P.M. Suero VLDL LDL HDL

Figura 5. Aislamiento de HDL y LDL humana por ultracentrifugación diferencial.

P.M: Marcador de peso molecular

3.2.2.8.3. Actividad PON-1 frente a estrés oxidativo y nitrosativo

Se determinó la actividad de la Paraoxonasa-1 (PON-1) asociada a la HDL en presencia o ausencia de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidroclorhidrato (AAPH, 5 mM, Sigma) o 3-morpholino sydnonimine (SIN-1, 10 μ M, Sigma) a través de la valoración de la actividad arilesterasa de la PON-1.

Para cada caso, se ensayaron diferentes concentraciones de ExA y NDGA. Los niveles de actividad de arilesterasa se determinaron en un espectrofotómetro de microplacas SpectraMax®. La velocidad de formación de fenol se controló cada 15 segundos (270 nm, temperatura ambiente) después de la adición de 20 μ l (dilución 1:80) de plasma o suero a 200 μ l de una solución de acetato de fenilo de 3,26 mmol/l (9 mmol/l Tris-HCL, pH 8,0, 0,9 mmol/l CaCl₂). Los resultados se expresaron como U/l usando la siguiente ecuación:

$$U/L = \Delta A / \text{minuto} \times F$$

Donde $F = (VT/VM) / 0,00131$

VT = Volumen total en μ l

VM = Volumen de muestra en μ l

0,00131 = coeficiente de extinción micromolar

3.2.2.8.4. WB de ApoA-1 en presencia de SIN-1

Se realizó una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE según Laemmli, de la HDL en ausencia (Control) y presencia de SIN-1 (20 mM), ExA (0,1 y 1,0 μ g/ml) o NDGA (0,0003 y 0,003 μ g/ml) y posterior transferencia a una membrana de PVDF usando Transblot SD Semidry Cell (Bio-Rad) a 15 V por 35 minutos. Para la detección de ApoA-1 se utilizaron anticuerpos conjugados con HRP (Anti-ApoA-1 (HRP) Abcam ab20784, 1:1.000 en 10% de NCS). Luego los blots fueron incubados con el reactivo ECL PLUS (Amersham), desarrollados y escaneados en un scanner quimioluminiscente (LICOR C-DIGit, LICOR biosciences) y procesados y cuantificados con el software Image Studio.

3.2.2.8.5. Oxidación de la LDL por CuSO₄

Para oxidar la LDL, se incubó 1 ml de las preparaciones ajustadas a 100 mg de proteína/ml con 10 mmol/L de buffer fosfato de sodio, pH 7,4, que contenía 150 mmol/L de NaCl, en presencia de CuSO₄ 80 mM fresco (Gugliucci y Menini, 2002). La oxidación de LDL se analizó a través de la determinación de las TBARS como se describe a continuación. La oxidación de la LDL se provocó en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de ExA (0,1; 1,0; 10 μ g/ml) y las relativas concentraciones de NDGA.

3.2.2.8.6. Determinación de TBARS de la LDL

Las preparaciones de LDL (500 μ l) se mezclaron con 1 ml de reactivo recién preparado que contenía 0,046 mol/L de ácido tiobarbitúrico, 0,92 mol/L de ácido tricloroacético y 0,25 mol/L de HCl. Después de 30 minutos de incubación a 100°C, las muestras se enfriaron en hielo, se centrifugaron a 1000 g durante 15 min a 4°C y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. La absorbancia de las muestras es proporcional a la formación de TBARS. 1,1,3,3, tetrametoxipropano (malondialdehído bis [dimetil acetal]) se usó como estándar. (Gugliucci y Menini, 2002; Gugliucci y Stahl, 1995).

3.2.3. Ensayos de actividad antioxidante en cultivos de Macrófagos

3.2.3.1. Determinación de Proliferación celular

Para evaluar la proliferación de los macrófagos RAW se utilizó la técnica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) modificada para medir la proliferación celular. Las células (2×10^5 células/ml) se incubaron en placas de 96 pocillos con las diferentes concentraciones de Glucosa, ExA, NDGA testeadas. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células se lavaron y se incubaron con 5 mg/ml de MTT (Sigma) durante 4 h. El formazán formado de acuerdo a la cantidad de células en los pocillos se extrajo con isopropanol ácido, y la absorbancia se midió en un lector de microplacas a 540 nm. Los resultados fueron expresados como proliferación (% del control) (Madesh y col., 1997)

3.2.3.2. Determinación de Nitritos totales.

Para determinar la producción de ON, los macrófagos se incubaron durante 24 hs. sin ningún tratamiento (basal) o con glucosa (5,5; 11; 55; 110 mM) sola o en presencia de diferentes concentraciones de ExA y NDGA. Las células se centrifugaron luego a 900x g durante 10 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante se separó para determinar los niveles de ON y las células en el sedimento se usaron para determinar la cantidad de células. Los nitritos totales acumulados en el medio de cultivo, indicadores de la producción de ON, se midió mediante la reacción de Griess (Becherel y col., 1997). Brevemente, se mezclaron 100 μ l de cada sobrenadante con 50 μ l de una solución de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5% y 50 μ l de una solución de dihidrocloruro de naftilenodiamina al 0,1%. La mezcla se incubó luego a temperatura ambiente durante 10 min, y se leyó la absorbancia a 550 nm. Como curva estándar, se emplearon diluciones seriadas (0-100 μ M) de una solución de NaNO_2 . Los niveles de ON se expresaron como nM / 10^6 células. Cabe remarcar que lo que se mide experimentalmente son nitritos totales, entre los que se encuentra el NO en mayor concentración, por lo tanto, un aumento de nitritos totales representa un aumento de los niveles de NO.

3.2.3.3. Determinación del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α)

Luego de 24 horas de incubación, la producción de TNF- α fue determinada en macrófagos tratados con y sin (Basal) glucosa 55mM y diferentes concentraciones de ExA (0,1; 1,0; 10 μ g/ml) o NDGA (0,0003; 0,003; 0,03 μ g/ml). TNF- α fue determinado en el sobrenadante del cultivo celular utilizando el kit comercial para ratones: TNF- α ELISA KIT (Chemicon International, Inc., CA, EE.UU.).

3.2.3.4. Determinación de Glutación reducido (GSH)

Los niveles de GSH se determinaron según Moron et al. (1979) en cultivos con diferentes concentraciones de glucosa y en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de ExA (0,1; 1,0; μ g/ml) o NDGA (0,0003; 0,003; 0,03 μ g/ml). En resumen, inmediatamente después de obtener los sobrenadantes, se precipitaron con 0,1 ml de TCA al 25%. Las muestras se centrifugaron y el precipitado se eliminó. Los grupos sulfhidrido libres se determinaron en un volumen total de 200 μ l. 134 μ l de DTNB 0.6 mM (5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico, Sigma) y 56 μ l de buffer fosfato de sodio 0,2 mM (pH 8,0) se agregaron a 10 μ l de cada sobrenadante y la absorbancia se leyó a 405 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Systronics. Se utilizó glutación (Sigma) como estándar para calcular y expresar los resultados como μ M GSH/ 10^6 células viables.

3.2.3.5. Determinación de ERO's intracelulares.

La producción de ERO's totales se determinó por el agregado del colorante Diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), el cual, por acción de las ERO's, se oxida a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto fluorescente, cuya fluorescencia fue medida por citometría de flujo. Se incubaron las células con concentraciones variables de glucosa (5,5; 11; 55 mM) en presencia o ausencia de ExA (0; 0,1; 1,0 μ /ml) o NDGA (0; 0,0003; 0,003 μ /ml). Se adquirieron más de 10.000 eventos por grupo en un citómetro de flujo FACSCalibur, y la intensidad de fluorescencia media de la población de células (IFM) fue obtenida de acuerdo a los gráficos de histogramas. Los resultados se expresaron como IFM de DCF.

3.2.3.6. Determinación de TBARS

Se determinó la concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (lipoperóxidos) en cultivos de macrófagos en presencia de distintas concentraciones de glucosa, ExA y NDGA. 20 μ l de los sobrenadantes de las muestras se mezclaron con 600 μ l de reactivo recién preparado que contenía 0,046 mol/L de ácido tiobarbitúrico. Después de 60 minutos de incubación a 95°C, las muestras se enfriaron en hielo, se centrifugaron a 1000 g durante 15 min a 4°C y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. La absorbancia de las muestras es proporcional a la formación de TBARS. 1,1,3,3, tetrametoxipropano (malondialdehído bis [dimetil acetal]) se usó como estándar. (Gugliucci y Menini, 2002; Gugliucci y Stahl, 1995).

3.2.3.7. Determinación de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los macrófagos incubados con generadores de peroxinitritos (3-morpholiniosydnonimine, SIN-1; SIGMA, EE.UU.) y de ERO's hidrosolubles (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH; SIGMA, EE.UU.) en presencia de diferentes concentraciones de ExA (0,1; 1,0; 10 μ g/ml) o NDGA (0,0003; 0,003; 0,03 μ g/ml), se utilizó el kit de ensayo de citotoxicidad LDH (Pierce, EE.UU.) que mide la LDH extracelular en medios de cultivo utilizando una reacción enzimática que produce un producto de formazán rojo que se puede medir espectrofotométricamente a 490nm. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica que es un indicador de toxicidad celular.

3.2.4. Ensayos de actividad antioxidante en glándulas submandibulares de rata

Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante de ExA y NDGA en glándulas submandibulares de animales sanos y de animales con diabetes inducida por la administración de estreptozotocina.

Los animales fueron manipulados de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (Número: 220612-1), y de acuerdo con la guía de cuidados y uso experimental de animales del U.S. Department of Health, Education and Welfare (DHEW Publication, NIH 80-23).

Se utilizaron ratas hembra (60 animales en total) pertenecientes a la cepa Wistar con un peso comprendido entre 150 y 200 g. Los animales fueron mantenidos en un cuarto con atmósfera e iluminación controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) y fueron alimentados con Purina® Chow y con agua *ad libitum*. El día anterior a los experimentos fueron sometidos a un ayuno de 24 horas.

Se realizaron dos experimentos, en el primer experimento se utilizaron 20 animales, que fueron divididos en 4 grupos de 5 animales cada uno y se procesaron como se explica en punto 3.2.4.1.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el 2^{do} experimento se utilizaron 40 animales, que fueron divididos en dos grupos de 20 animales cada uno, uno considerado normal y otro tratado con estreptozotocina, que se procesaron como se explica en 3.2.4.1.

Inducción de diabetes por estreptozotocina: La mitad de los animales (15) se usaron como control y fueron tratados con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) (ClNa 8,6 g, KH₂PO₄ 0,43 g, Na₂HPO₄ 1,18 g / litro de agua), vía i.p.. La otra mitad fue inyectada con una dosis única de estreptozotocina (60 mg/kg) vía i.p. Luego de 10 días de la administración de estreptozotocina, se determinaron los niveles de glucemia, en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal, con tiras reactivas Acucheck[®] y se determinó el contenido de proteínas en suero por el método de Lowry y col. (1951). Aquellos animales con niveles de glucemia superiores a 300 mg/dl conformaron el grupo de animales tratados. Todos los animales (control y tratados) fueron pesados y sometidos a eutanasia, y se les extirparon las glándulas submandibulares.

3.2.4.1. Preparación y tratamiento de las glándulas submandibulares

Se procedió a la remoción del tejido graso, los ganglios linfáticos y el tejido conectivo con ayuda de una lupa. Las glándulas fueron pesadas e incubadas en buffer Krebs-Henseleit pH 7.4 a 37°C durante 10 minutos en presencia de 95 % O₂ y 5 % CO₂. Una vez alcanzadas las condiciones de equilibrio, las glándulas fueron incubadas durante 40 min en las siguientes condiciones:

Experimento 1: las glándulas de 2 grupos de 5 animales fueron tratados con ExA en las siguientes concentraciones: 25,50,100,500 y 1000 µg/ml, de manera tal de realizar el ensayo por duplicado. En cada caso una glándula del mismo animal se usó como control, incubada con buffer Krebs-Henseleit y la otra fue sometida a tratamiento. Por otro lado, se utilizaron 2 grupos de 5 animales para repetir el experimento en las mismas condiciones explicadas con NDGA en las siguientes concentraciones: 0,084, 0,17,0,34, 0,55 y 3,41 µg/ml.

Experimento 2: El primer grupo de animales no tratados con estreptozotocina se dividieron de la siguiente manera: Las glándulas de 2 grupos de 5 ratas fueron tratadas con 500 µg/ml de ExA y las glándulas del resto de los animales fueron tratadas con 1,5 µg/ml de NDGA. La mitad de cada tratamiento fue utilizado para realizar los estudios histológicos. El mismo esquema fue utilizado con las glándulas de los animales tratados previamente con estreptozotocina.

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se retiró el medio de incubación con una pipeta y las glándulas fueron homogeneizadas en buffer Krebs-Henseleit conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10⁻⁴ M (inhibidor de proteasas) y EDTA 10⁻³ M para obtener el homogeneizado de las glándulas. Una vez sometidas al proceso de homogeneización fueron centrifugadas a 1000 x g durante 15 minutos a 5°C (Anesini y col., 2004).

En el sobrenadante correspondiente al homogeneizado se determinó el contenido de proteínas de cada glándula por el método de Lowry y col. (1951).

3.2.4.2. Determinación de los parámetros oxidativos

3.2.4.2.1. Peróxido de hidrógeno

La determinación de peróxido de hidrógeno se realizó en los homogenatos de las glándulas. Para ello, 50 µl fueron incubados con 100 µl de una solución que contenía: 3-3'diaminobencidina (DAB) 0,56 mM, NaCl 140 mM, fosfato diácido de potasio 10 mM, dextrosa 5,5 mM, y peroxidasa de rábano tipo II, 0,01 mg/ml. Luego de 1 hora de incubación, la reacción fue interrumpida con el agregado de 10 µl de una solución de NaOH 4 N. Se determinó la absorbancia a 650 nm en un lector de placas de ELISA y los valores obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración de H₂O₂. Los resultados se expresaron en moles de H₂O₂/g glándula.

3.2.4.2.2. Anión superóxido

La determinación de anión superóxido se realizó de acuerdo con el método descrito por Schopf y col. (1984). Para ello, se incubaron 50 µl de los homogenatos de glándulas con 200 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,1 % y 50 µl de PBS durante 30 minutos en tubos Eppendorf®. La reacción fue detenida con el agregado 500 µl de HCl 1N. Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y los cristales de formazán se extrajeron con 300 µl de dioxano. Se tomaron 200 µl de la solución anterior y se colocaron en placas de ELISA. A continuación, se determinó la absorbancia a 550 nm en espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en nmoles de NBT reducido/g glándula.

3.2.4.2.3. Óxido nítrico

La determinación de óxido nítrico se realizó a través de la valoración de los nitritos totales utilizando el reactivo de Griess (Becherel y col., 1997). Para ello, 50 µl de homogenato de glándulas fueron incubados con 100 µl del reactivo de Griess (2,5 ml de (α -naftil) etilendiamida 0,1 % + 5 ml ác. sulfanílico 2,4 % + 2,5 ml de una solución de ácido clorhídrico preparada de la siguiente forma: ácido clorhídrico fumante: agua destilada (1:30)) durante 15 minutos en oscuridad. A continuación, se determinó la absorbancia a 540 nm. Los nitritos totales fueron determinados por interpolación en una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de nitritos ($7,7 \times 10^{-4}$ a 0,025 mM) preparadas a partir de nitrito de sodio y los resultados se expresaron como mmoles de ON/g de glándula.

3.2.4.3. Determinación de la peroxidación lipídica.

Los niveles de peroxidación lipídica se analizaron mediante la determinación de la tasa de producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico expresados como malondialdehído (MDA), según Ohkawa et al., (1979) con ligeras modificaciones. En resumen, se trataron 10 µl de homogenato de glándulas o 10 µl de suero con una mezcla de 100 µl de TCA al 20% y ácido tiobarbitúrico al 0,5% (TBA) y 100 µl de butilhidroxitolueno (BHT) (4% en etanol). La mezcla reactiva se calentó a 90°C durante 30 min. Luego, se dejó enfriar y se centrifugó durante 10 minutos a 800 x g. El contenido de MDA se determinó espectrofotométricamente a 532 nm y 600 nm (absorbancia inespecífica) y la concentración se determinó calculando la diferencia entre los valores medidos a 532 nm y 600 nm utilizando el coeficiente de extinción molar ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Finalmente, el contenido de MDA se expresó en nmol/g glándula.

3.2.4.4. Determinación de la oxidación de proteínas

El ensayo para la detección de la oxidación de proteínas se basó en la generación de grupos carbonilo. Brevemente, se incubaron alícuotas de homogenato de glándulas de ratas normales (500 µg de proteínas, cuantificadas previamente por Lowry) en ausencia (Basal) o presencia de diferentes concentraciones de ExA (25, 50, 100, 500 y 1000 µg/ml) o NDGA (0,084; 0,17; 0,34; 1,55; 3,41 µg/ml).

MATERIALES Y MÉTODOS

La generación de grupos carbonilo se detectó por derivación con 500 µl de 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) 10 mM, lo que conduce a la formación de un producto estable de 2,4-dinitrofenil (DNP) hidrazona. Luego se agregó 500 µl de TCA (30%) para precipitar las proteínas y descartar restos de lípidos y DNPH libre. Después de tres lavados con 1ml de etanol-etilacetato (1:1) se solubilizo el pellet con 1 ml de guanidina 6M. Luego se tomó 1ml de este producto y se midió el contenido de grupos carbonilos a 375 nm usando el coeficiente de extinción molar del DNPH (22000 moles/litro/cm). El número de grupos carbonilo se expresó como nmol/glándula (Levine y col., 1990).

3.2.4.5. Actividad enzimática glandular

Las actividades antioxidantes enzimáticas se determinaron en homogenatos y medio de incubación de glándulas control (sin ningún tratamiento) y de glándulas tratadas con ExA o NDGA de animales normales y tratados con STZ.

3.2.4.5.1. Actividad Peroxidasa (Px)

La actividad de la peroxidasa se determinó de acuerdo con Herzog y Fahimi (1973). Brevemente, las muestras se incubaron con 775 µl de tetrahidrocloreuro de diaminobencidina 5×10^{-4} M 3,3 (DAB, Sigma) y 25 µl de H₂O₂ (Parafarm R, 30% v/v diluido 1/86 en agua destilada). La reacción se inició mediante la adición de H₂O₂. DAB sin H₂O₂ se utilizó como blanco. El cambio en las lecturas de absorbancia se registró a intervalos de 30 s durante 5 min usando un espectrofotómetro de registro Shimadzu UV-240 (impresora gráfica PR-1) establecido a 465 nm, y se calculó la absorbancia / min. La actividad de las muestras se derivó de una curva estándar que muestra una relación lineal entre la actividad enzimática y la diferencia de absorbancia/min. Los resultados se expresaron como actividad total de Px U/ml/g glándula = actividad de glándulas homogeneizadas + actividad determinada en medio de incubación

3.2.4.5.2. Actividad Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad superóxido dismutasa se determinó por su capacidad para inhibir la oxidación espontánea de adrenalina a adrenocromo, que se midió espectrofotométricamente a 480 nm.

Se colocaron 50 µl de los homogenatos en el tubo de reacción, se adicionaron 910 µl de buffer fosfato 0,05 M, pH 10,7 (48,32 ml PO₄HNa₂0,05 M + 1,68 ml NaOH 0,05 M), y en el momento de comenzar la reacción se agregaron 40 µl de adrenalina 2 mM. Luego del agregado de la adrenalina, se midió la formación del adenocromo espectroscópicamente a 480 nm en forma cinética durante 5 minutos (cada 10 segundos) y se calculó el Δ Abs/min.

La actividad SOD se calculó determinando el Δ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la muestra obtenido en la porción lineal de la curva y el Δ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la adrenalina (control de auto-oxidación). Luego se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación de la adrenalina según la siguiente ecuación: % de Inhibición = [Δ Abs/min adrenalina (control de auto-oxidación) - Δ Abs/min muestra] / Δ Abs/min adrenalina (control de auto-oxidación) x 100

La actividad SOD se calculó teniendo en cuenta que 1 U SOD inhibe la auto-oxidación de la adrenalina en un 50 %.

Los resultados se expresaron como actividad total de SOD U/ml/g glándula = actividad de glándulas homogeneizadas + actividad determinada en medio de incubación (Carrillo y col., 1991).

3.2.4.5.3. Actividad Catalasa (CAT)

La determinación de la CAT se realizó de acuerdo con el método descrito por Carrillo y col. (1991). Este método evalúa la capacidad de la enzima de descomponer el H_2O_2 en O_2 y H_2O . El H_2O_2 absorbe a 240 nm, por lo tanto, una disminución en la absorbancia indica la capacidad eliminadora del H_2O_2 .

Los homogenatos fueron incubados en buffer fosfato de sodio (50mM; pH: 7,0) conteniendo 100mM de H_2O_2 y la actividad catalasa se determinó en forma cinética, midiendo el cambio en la absorbancia por minuto (Δ Abs/min) a 240 nm durante 5 minutos.

Con el Δ Abs/min promedio (velocidad promedio) de la muestra determinado en la porción lineal de la curva se calculó la concentración de H_2O_2 degradado por minuto teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar a 25°C y pH=7 del H_2O_2 ($0,0394 \mu\text{M}/\text{min}/\text{cm}^2$) (Nelson y Kiesow, 1972). Una vez calculada la concentración de H_2O_2 degradado por minuto se calculó la actividad catalasa sabiendo que 1 unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1 μmol de H_2O_2 . Los resultados se expresaron como actividad total de CAT U/ml/g glándula = actividad de glándulas homogeneizadas + actividad determinada en medio de incubación

3.2.4.6. Determinación de Glutati3n reducido (GSH)

Los niveles de GSH se determinaron segun Moron et al., (1979). En resumen, inmediatamente despues de obtener los homogenatos, se precipitaron con 0,1 ml de TCA al 25%. Las muestras se centrifugaron y el precipitado se elimin3. Los grupos sulfhidrilo libres se determinaron en un volumen total de 200 μl . 134 μl de DTNB 0.6 mM (5,5'-ditio-bis-3cido 2-nitrobenzoico, Sigma) y 56 μl de buffer fosfato de sodio 0,2 mM (pH 8,0) se agregaron a 10 μl de cada sobrenadante y la absorbancia se ley3 a 405 nm en un espectrof3tmetro UV-VIS Systronics. Se utiliz3 glutati3n reducido est3andar (Sigma, EE.UU.) para calcular μmol GSH/g de tejido.

3.2.4.7. Par3metros bioqu3micos

Las determinaciones bioqu3micas fueron llevadas a cabo por Bioq. Rodolfo Rodr3guez, Instituto D3vila de An3lisis Cl3nicos, a trav3s de m3todos automatizados acreditados con controles de calidad externos internacionales bajo buenas pr3cticas de laboratorio segun PREVECAL (www.prevecal.net). Para ello se enviaron muestras de plasma y suero de los animales control y tratados con STZ. Se determino: Glucemia, prote3nas plasm3ticas, Uremia, Acido Urico, Creatinina, Triglic3ridos, Colesterol, TGO y TGP, y valores hematol3gicos (gl3bulos rojos y blancos, Hemoglobina, Hematocrito y Formula leucocitaria). Las muestras de sangre fueron obtenidas por exanguinaci3n por punci3n card3aca de animales seleccionados al azar.

3.2.4.8. Estudios histol3gicos

Para estos estudios, muestras de gl3ndulas de un grupo de 10 animales control normales y 10 animales tratados con STZ cuyas gl3ndulas se trataron in vitro con el extracto de ExA o con NDGA se fijaron en una soluci3n de formalina al 10% a temperatura ambiente. Los tejidos se incrustaron en parafina y las secciones de 5 μm se cortaron, se ti3nieron con hematoxilina-eosina, y se montaron en portaobjetos de vidrio para microscop3a 3ptica y exploraci3n. Las muestras se analizaron a 200 x en un Aperio CS Scanscope.

3.2.4.9. Análisis de la expresión de Peroxidasa por Westernblot.

Los homogenatos de glándulas (40 µg de proteína /calle) se fraccionaron por tamaño mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron durante 90 minutos en solución salina con buffer Tris (TBS, pH 7,5) y 3% de leche sin grasa, se lavaron y se incubaron durante la noche con una dilución 1: 200 de un anticuerpo anti-peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EE.UU.). Las membranas se lavaron con TBS-0.05% -Tween 20 y se incubaron con una dilución de 1: 1000 de un antisuero de cabra conjugado anti-conejo-HRP (peroxidasa de rábano picante) (Sigma, EE.UU.). La inmunodetección se realizó con el kit de reactivos de quimioluminiscencia Western Blot (NEN Life Science, Boston, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bandas de proteínas inmunorreactivas se analizaron con el software Corel Photopaint 9.0.

3.2.4.10. Análisis de la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) por Westernblot

Para la determinación de los niveles de iNOS, se disolvieron los homogenatos de las glándulas de los animales control y tratados con STZ en un buffer de muestra (SDS al 2%, glicerol al 10% (v / v), Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, bromofenol al 0,2% y 2-mercaptoetanol 10mM). Se separaron cantidades iguales de proteínas mediante SDS-PAGE en geles de poliácridamida al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con un buffer de bloqueo (5% de leche seca no grasa que contiene, Tween-20 al 0,1% en buffer Tris-HCl 100 mM y NaCl al 0,9%, pH 7,5) durante 2 hs. La membrana de PVDF se incubó posteriormente con un anticuerpo anti-iNOS (Sigma, EE.UU.) durante 18 h. Se utilizó un anticuerpo anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) como control de carga. Después de lavar con PBS-Tween, la membrana se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (Amersham Biotech, Inglaterra) diluido 1: 2000 en PBS-Tween. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando tecnología ECL (Amersham Pharmacia, Inglaterra). Se realizó un análisis densitométrico con el software Image J (versión 5.1, Silk Scientific Corporation, EE.UU.). Los valores de densitometría de iNOS (unidades arbitrarias) en cada línea se normalizaron a los valores de densitometría de actina correspondientes.

3.2.4.11. Análisis estadístico

En cada experimento en particular se aclara el análisis estadístico realizado ya que debido a la diferente naturaleza de los ensayos realizados se debe tomar cada caso en particular. En algunos casos se determinó la media y su error estándar (ESM) y en otros la media y el desvío estándar (DS). La significancia entre las medias fue analizada a través de la aplicación de la prueba de ANOVA para comparación de diferentes grupos de tratamientos, y luego de la prueba de Dunnett para comparación de datos con el control. La comparación de dos medias se realizó mediante la prueba T de Student para muestras no apareadas. En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas cuando p resultó menor o igual a 0,05.

3.2.5. Estudios Farmacológicos “in vivo”

3.2.5.1. Estudio de la toxicidad sub-crónica de ExA

La toxicidad oral sub-crónica se realizó de acuerdo con las instrucciones establecidas por la normativa de la OECD número 407 (OECD, 2008). 50 ratones C3H/He, de 7 semanas de edad (Provistos por departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA), se dividieron en 5 grupos de 10 animales (5 hembras y 5 machos). El extracto, resuspendido en solución fisiológica, se administró a diferentes grupos de ratones en dosis de 25, 50, 250 mg/kg/día respectivamente. Se administró 1mL de las diferentes concentraciones utilizando una cánula de intubación, y se separó un grupo que recibió solución fisiológica y se consideró como control. Otro grupo fue tratado con una dosis de NDGA 1.45 mg/kg/día (esta dosis representa la cantidad aproximada de NDGA encontrada en 250 mg/kg de ExA, cuantificada por HPLC).

Luego de 28 días, se recogió sangre por punción cardiaca en recipientes recubiertos con EDTA y sin recubrimiento. Se realizó un análisis de sangre completo utilizando un analizador automático Coulter LH 750 (Beckman, Pasadena, California, EE.UU.) determinándose glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración media de la hemoglobina corpuscular, índice de la distribución del glóbulo rojo, glóbulos blancos y fórmula leucocitaria (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos) y recuento de plaquetas. La actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) (IU/L) se determinó en suero con un kit comercial (Wiener Lab. Rosario. Argentina), el colesterol (mg%) y los triglicéridos (mg%) fueron evaluados por métodos colorimétricos. También se determinó la creatinina (mg/dl) en suero utilizando un método cinético-colorimétrico. Inmediatamente después de la extracción de sangre, los animales tratados y no tratados fueron sacrificados y sometidos a autopsia. Brevemente, los órganos fueron ponderados y varios trozos de tejido de 3-5 mm de espesor se fijaron en una solución de 0,9% de NaCl en formaldehído al 10% durante 24 h y se lavaron en agua corriente por otras 24 hs. Las muestras fueron deshidratadas pasando a través alcohol de 50, 70, 90, y 100% durante dos días, y después se las lavo con benceno para quitar el alcohol hasta que los tejidos se hicieran transparentes. Luego las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron utilizando un microscopio óptico.

3.2.5.2. Modelo de Diabetes inducida por estreptozotocina en ratones.

Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante de los ExA en animales sanos y en animales con diabetes inducida por la administración de estreptozotocina. Los animales fueron manipulados de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (Número: 220612-1), y de acuerdo con la guía de cuidados y uso experimental de animales del U.S. Department of Health, Education and Welfare (DHEW Publication, NIH 80-23).

3.2.5.2.1. Inducción de la diabetes por administración de estreptozotocina

Se utilizaron ratones hembra (42 animales) pertenecientes a la cepa Balb-c con un peso comprendido entre 18 y 21 g. Los animales fueron mantenidos en un cuarto con atmósfera e iluminación controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) y fueron alimentados con Purina[®] Chow y con agua *ad libitum*.

Inducción de diabetes por estreptozotocina: Luego de una semana de adaptación, se hizo un grupo control: 6 animales fueron tratados con solución fisiológica, 6 animales fueron tratados con ExA durante un mes por vía oral (grupo ExA oral) y 6 con ExA por vía intraperitoneal (grupo ExA i.p.). Al resto de los animales se les administró una dosis de 40mg/kg/día de Estreptozotocina (en buffer citrato

MATERIALES Y MÉTODOS

pH: 4,5), por vía i.p., durante 5 días. Luego, se determinaron los niveles de glucemia en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal en ayunas, con tiras reactivas Acucheck®. Aquellos animales (n:18) con niveles de glucemia superiores a 150 mg/dl fueron separados aleatoriamente en los siguientes grupos: grupo STZ, grupo STZ+ExA oral y grupo STZ+ExA i.p.. Los animales tratados con ExA recibieron una dosis diaria de ExA (disuelto en Solución Fisiológica) de 1000mg/kg/día por vía oral (con trocar) o vía i.p.

Una vez finalizado el experimento todos los animales que participaron en el experimento fueron pesados, anestesiados y se practicó exanguinación por punción cardiaca para posteriores determinaciones bioquímicas. Luego los páncreas, hígados y riñones fueron removidos para el análisis histológico.

3.2.5.2.2. Determinación de la glucemia

La glucemia fue determinada semanalmente a través del método de la glucosa deshidrogenasa con el glucómetro electroquímico de Accu-check (Roche Diabetes Care) en sangre de la vena caudal de los animales.

3.2.5.2.3. Determinaciones plasmáticas

Para la determinación de colesterol total, triglicéridos y lipoperóxidos se extrajo sangre por punción cardiaca de los animales anestesiados. La sangre se recolectó en tubos heparinizados, los cuales fueron centrifugados para separar el plasma.

3.2.5.2.3.1. Determinación del colesterol total

Se realizó a través de un kit comercial (Wiener Lab.) con método enzimático colorimétrico. Se incubaron 10ul de los plasmas con 1ml del reactivo de trabajo (colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona en buffer Good pH=6.8 con fenol y colato de sodio) durante 5 minutos a 37°C y se determinó la absorbancia a 505nm. Los resultados, expresados como g/l, fueron extrapolados a partir de una curva de calibración con una solución estándar de colesterol según instrucciones del fabricante.

3.2.5.2.3.2. Determinación de los triglicéridos totales

Se realizó a través de un kit comercial (Wiener Lab.) con método enzimático colorimétrico. Se incubaron 10ul de los plasmas con 1ml del reactivo de trabajo (lipoprotein lipasa, glicerol quinasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa, ATP, 4-aminofenazona en buffer Good pH=7,5 con clorofenol) durante 5 minutos a 37°C y se determinó la absorbancia a 505nm. Los resultados, expresados como g/l fueron extrapolados a partir de una curva de calibración con una solución estándar de glicerol según instrucciones del fabricante.

3.2.5.2.3.3. Determinación de lipoperóxidos plasmáticos (TBARS)

500µl de plasma se mezclaron con 1 ml de reactivo recién preparado que contenía 0,046 mol/L de ácido tiobarbitúrico, 0,92 mol/L de ácido tricloroacético y 0,25 mol/L de HCl. Después de 30 minutos de incubación a 95°C, las muestras se enfriaron en hielo, se centrifugaron a 1000 g durante 15 min a 4°C y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. La absorbancia de las muestras es proporcional a la formación de TBARS. 1,1,3,3, tetrametoxipropano (malondialdehído bis [dimetil acetal]) se usó como estándar. (Gugliucci, 1995; Gugliucci y Menini, 2002; Gugliucci y Stahl, 1995).

3.2.5.2.4. Estudios histológicos

Una vez sacrificados los animales, sus órganos fueron diseccionados y enviados al Instituto de Ciencias Anatómicas Aplicadas Prof. Dr. Sergio Provenzano (Facultad de Medicina, UBA). Para la evaluación histopatológica de hígado, riñón y páncreas se realizaron las tinciones con hematoxilina-eosina (H-E) sobre secciones transversales de tejido de 5µm de espesor. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio (Olympus).

3.2.5.2.4.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina

La hematoxilina es un colorante natural de características básicas que tiñe estructuras ácidas o basófilas, como los núcleos, de color púrpura o violeta. Contrariamente, la eosina es una tintura ácida que se une a componentes básicos presentes en el espacio intra y extracelular, los cuales adquieren una coloración rosa-anaranjada. La tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E) continúa siendo el método más ampliamente utilizado en histología e histopatología, ya que permite visualizar fácilmente la organización estructural de un tejido, su microanatomía y sus células individualizadas con sus núcleos.

Luego del corte histológico del material embebido en parafina utilizando un micrótopo rotatorio (Erma LTE 610, Laboratorio Somaco), las secciones transversales de hígado y páncreas fueron desparafinizadas con xileno y rehidratadas en distintos grados de alcohol etílico (100°, 95° y 70°, respectivamente). Primero, se colorearon los núcleos por inmersión durante 15 minutos en una solución de hematoxilina de Mayer. Luego, se retiró el exceso del colorante con agua. Por último, los cortes se sumergieron durante 30 segundos en solución de trabajo de eosina (250 ml de solución madre en 750 ml de etanol 80° y 5 ml de ácido acético glacial - Solución madre de eosina: 10 gramos de Eosina Y en 200 ml de agua destilada y 800 ml de etanol 96°) luego se lavaron rápidamente con agua y fueron deshidratados nuevamente con lavados de etanol de 70°, 95° y 100°, respectivamente. Finalmente, se limpiaron con xileno y se montaron con Bálsamo de Canadá. Las muestras fueron analizadas mediante el software Zen Lite Blue Edition 2.3.

3.2.5.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó sobre experimentos independientes realizados por sextuplicado. En todos los casos se determinó la media y su desvío estándar (DS). La significancia entre las medias fue analizada a través de la aplicación de la prueba de ANOVA para comparación de diferentes grupos de tratamientos, y luego de la prueba de Dunnett para comparación de datos con el respectivo control. La comparación de dos medias se realizó mediante la prueba T de Student para muestras no apareadas. En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas cuando p resultó menor o igual a 0,05.

3.2.6. Estudios Farmacocinéticos

3.2.6.1. Método cromatográfico para la determinación de NDGA en plasma de rata.

Se desarrolló un método isocrático para la valoración de NDGA en plasma por HPLC. Se utilizó un equipo Varian ProStar equipado con un inyector Rheodyne (20 µl), horno a 30 °C y detector de arreglo de diodos a 280 nm.

Fase móvil: Metanol: Agua: ácido Acético (70:30:2)

Fase estacionaria: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm x 5µ)

Flujo: 1.2 ml/min

Tiempo de retención: 3.1 minutos.

Tiempo de corrida 6 minutos

Procesamiento de muestras de plasma para realizar la curva de calibración: a 100 µl de plasma suplementado con NDGA estándar (Sigma, EE.UU.) se agregaron 10µl de estándar interno (Quercetina) y 1 ml de éter. Se vortexeó durante 15 seg. cuatro veces y se colocó en el freezer una hora hasta que se congeló la fase acuosa. Luego, se separó la fase etérea y se evaporó el éter en un rotavapor a 65°C. Al residuo obtenido se lo re-suspendió en 100 µl de fase móvil.

Estándar interno: se pesaron 4 mg de quercetina estándar (Sigma, EE.UU.) y se transvasaron a matraz de 50 ml, se agregaron 25 ml de metanol agua (70:30). Luego, se sonicó hasta disolución y se llevó a volumen con el mismo disolvente. El tiempo de retención del estándar interno fue 2.3 minutos.

Para el ensayo se utilizaron 4 ratas Wistar Kyoto macho de 330-380 g que fueron alojados 2 por jaula en condiciones de humedad 60±5 % y de temperatura 22 ± 2°C de acuerdo con las reglamentaciones de SENASA, con libre acceso a agua y comida. Los animales fueron mantenidos en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se les administró el extracto por vía oral por trocar en una dosis de 1g/kg y se recolectó sangre de la vena caudal (100 µl aproximadamente) a los siguientes tiempos: 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos, utilizando heparina como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10 min y el sobrenadante (70 µl aprox.) fue separado y procesado en iguales condiciones que la curva de calibración.

Los datos de los niveles plasmáticos a cada tiempo fueron analizados con el software Topfit 2.0. (Heizel y col.,1993), que permite evaluar distintos modelos con diferente números de compartimentos, y calcula en el caso de que se trate de un compartimento los siguientes parámetros farmacocinéticos: ABC_f, ABC_t, Ke, T_{1/2}, MRT, V_d y Cl_r.

3.2.6.2. Ensayo de digestión gastrointestinal simulada

3.2.6.2.1. Preparación de los medios gástrico e intestinal

El medio gástrico simulado fue preparado de acuerdo con los procedimientos de la USP (United States Pharmacopoeia) mezclando 2,0 g de NaCl, 3,2 g de Pepsina y 3,0 ml de HCl concentrado en un litro de H₂O MilliQ y ajustando el pH a 1,2-1,8. Las muestras fueron incubadas 60 y 120 minutos en este medio a 37°C utilizando un disolutor con una velocidad de agitación de 100 rpm.

El medio intestinal simulado también se preparó de acuerdo a los procedimientos de la USP, mezclando 6,8 g de fosfato de potasio monobásico, 650 ml de agua MilliQ, 190 ml de NaOH 0,2 mol/l y mix pancreático (10g). En este caso las muestras fueron incubadas 120 y 240 minutos a 37°C en un disolutor con una velocidad de agitación de 100 rpm.

3.2.6.2.2. Incubación de ExA en fluido gastrointestinal simulado

500mg de ExA comprimidos en una píldora se incubaron en medio gástrico a 37 °C por dos horas. Luego, la mezcla se incubó en fluido intestinal a 37 °C cuatro horas. Estos pasos se realizaron para simular el proceso digestivo. Distintas alícuotas se recolectaron en los tiempos previamente mencionados para realizar las siguientes determinaciones: Polifenoles totales, flavonoides y se cuantificó NDGA. Por otro lado, se evaluó la actividad eliminadora de radicales DPPH, así como el poder reductor. El experimento se realizó por triplicado (Lena et al, 2004).

4. RESULTADOS

4.1. Estudios fitoquímicos de ExA

4.1.1. Identificación y cuantificación de NDGA y Rutina por HPLC.

Se informan los datos de validación para el NDGA que es el marcador del extracto. El coeficiente de correlación obtenido fue adecuado: R^2 : 0,999 (Figura 6). La exactitud y la precisión inter e intraensayo fue calculada en tres niveles de concentraciones: 0,8, 8 y 80 $\mu\text{g/ml}$ por triplicado. Los valores obtenidos para exactitud fueron: 98,0% a 100,1% y el promedio obtenido fue $99,418 \pm 1,064\%$. La precisión intraensayo para 0,8 $\mu\text{g/ml}$ fue de entre 2 y 4 % y para 8 y 80 $\mu\text{g/ml}$ menor al 2% en todos los casos. La precisión interensayo para el valor de 0,8 fue menor a 3% y para el resto menor al 1%. Límite de cuantificación 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y límite de detección: 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

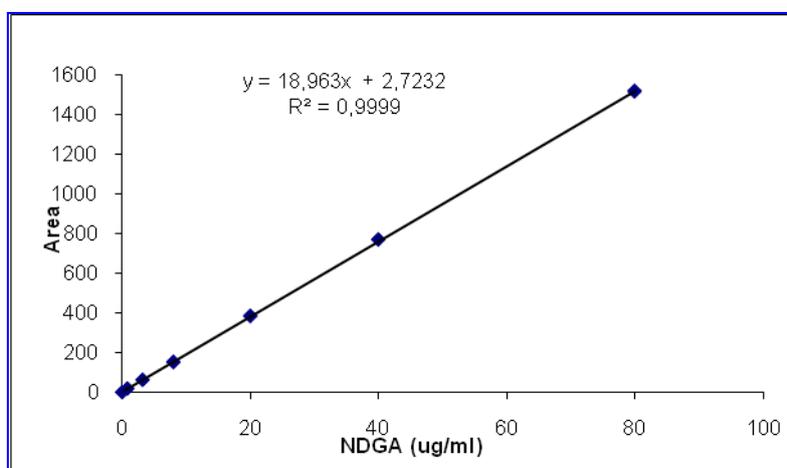


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de NDGA en muestras de ExA.

La presencia de NDGA fue confirmada por HPLC. El NDGA presentó un tiempo de retención de 46 min. Según el análisis del área bajo la curva la cantidad de NDGA presente en ExA fue de 0,30 g% de ExA (Figura 7).

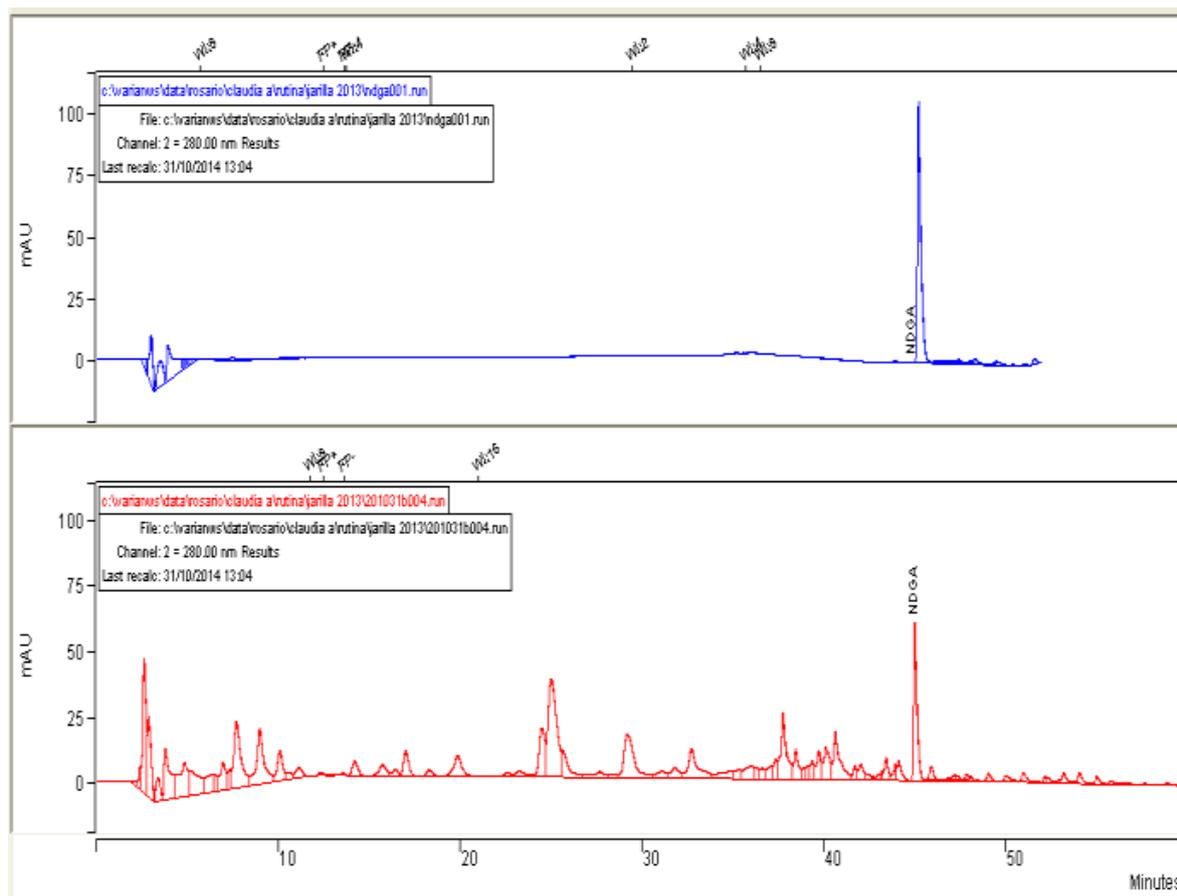


Figura 7. Identificación y cuantificación de NDGA en ExA (λ :280nm).

Cromatograma de NDGA (testigo) en azul y de ExA en rojo

Así mismo, se confirmó la presencia de Rutina en ExA que presentó un tiempo de retención de 31,6 minutos (Figura 8). Según el análisis del área bajo la curva la cantidad de Rutina presente en ExA fue de 0,10 g% de ExA (Tabla 3)

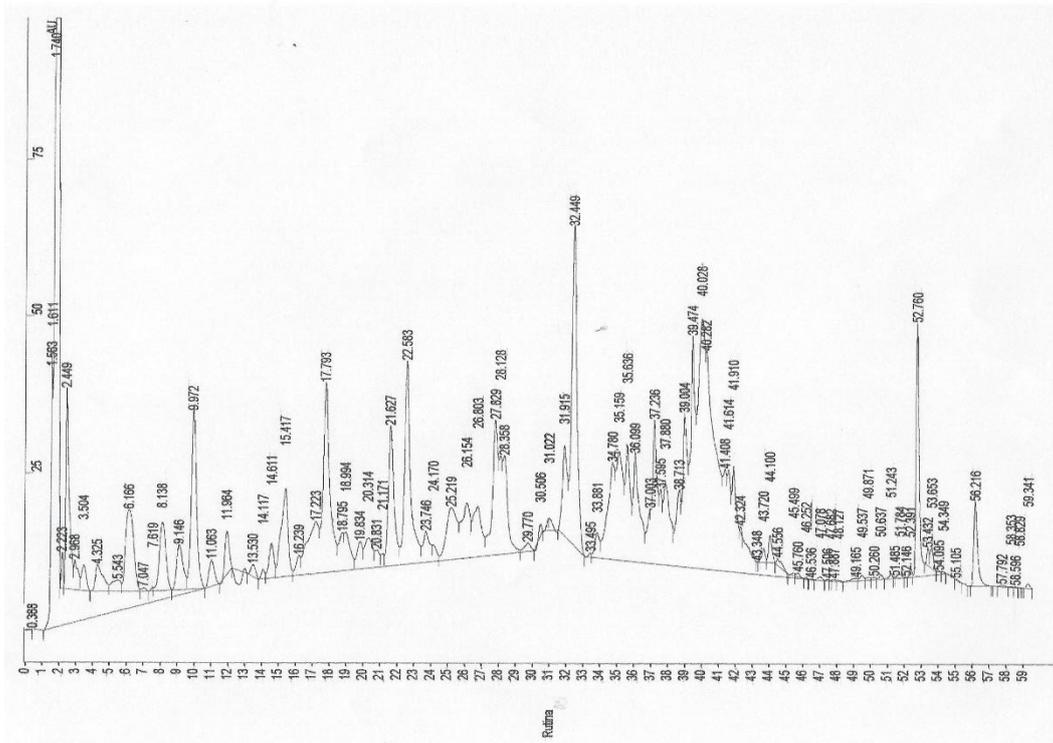
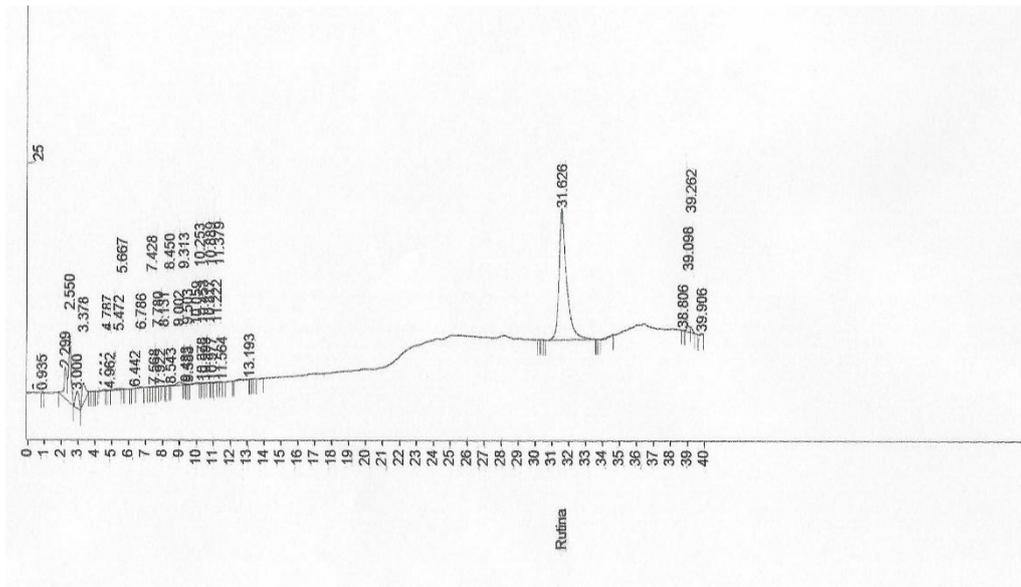


Figura 8. Identificación y cuantificación de Rutina en ExA ($\lambda:255\text{nm}$)

Cromatograma de Rutina estándar (arriba) y de ExA (abajo). Tiempo de retención 31,6 minutos

Se confirma la presencia de NDGA y Rutina en ExA

4.1.2. Cuantificación de flavonoides y polifenoles totales.

Se realizó la determinación del contenido de polifenoles y flavonoides totales a través de espectrofotometría. Cabe destacar que estos son el grupo y subgrupo (respectivamente) de mayor importancia que pueden encontrarse en los extractos acuosos. Se adjuntan los resultados en la Tabla 3.

Composición Fitoquímica de ExA	
Cuantificación	g%
NDGA	0,30± 0,01
Rutina	0,10± 0,01
Polifenoles totales	10,68 ± 0,43
Flavonoides totales	2,46 ± 0,16

Tabla 3. Composición fitoquímica de ExA.

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres determinaciones.

4.1.3. Identificación de compuestos por HPLC

4.1.3.1. Método 1: INTI

Una muestra de ExA liofilizado fue enviada al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de masas del Centro de Química del Instituto Nacional de Tecnología (INTI) para identificar los dos picos de mayor intensidad después del NDGA. A continuación, se muestra el informe recibido:

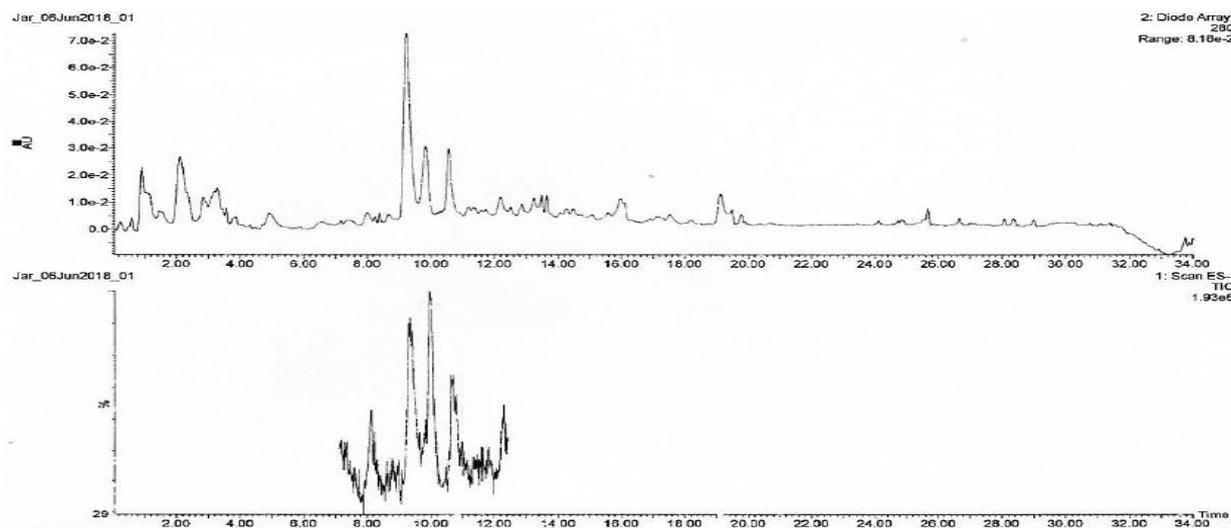


Figura 9. Cromatogramas de ExA

a) Detector UV (280nm), b) TIC (Total Ion Chromatogram) de Barrido (100-800) ESI

RESULTADOS

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para los dos picos de interés basados en las fragmentaciones e información hallada en bibliografía por el INTI y en la Figura 10 los esquemas moleculares:

Tiempo de retención (tr)	Ion cuasimolecular MS m/z	Hijos MS/MS m/z	Molécula sugerida
9,85 min	303	151, 136, 121	Dihidroquercetina C ₁₅ H ₁₂ O ₇ ; PM: 304g/mol
10,53 min	273	121, 106	Phloretin C ₁₅ H ₁₄ O ₅ PM: 274 g/mol

Tabla 4. Resultados obtenidos para dos picos principales de ExA

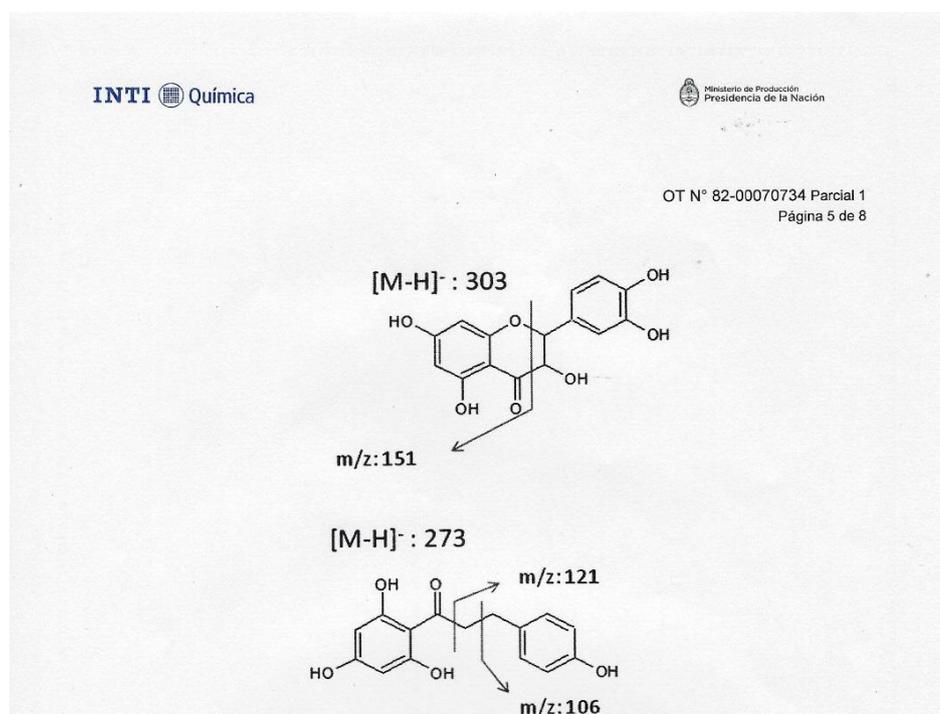


Figura 10. Esquema de las estructuras sugeridas y sus posibles fragmentaciones

a) Dihidroquercetina, b) Phloretin

El método 1 indica la presencia de Dihidroquercetina (Taxifolina, PM: 304g/mol) y Phloretin (familia Chalcona) (PM: 274g/mol)

4.1.3.2. Método 2: CIDEDEC

Por otro lado, el método 2 en modo positivo sugiere la presencia de los siguientes flavonoides: Rutina, Epicatequina, Quercetina-3-O-arabinopiranosido y Quercetina-3-O-galactosido (Figura 11).

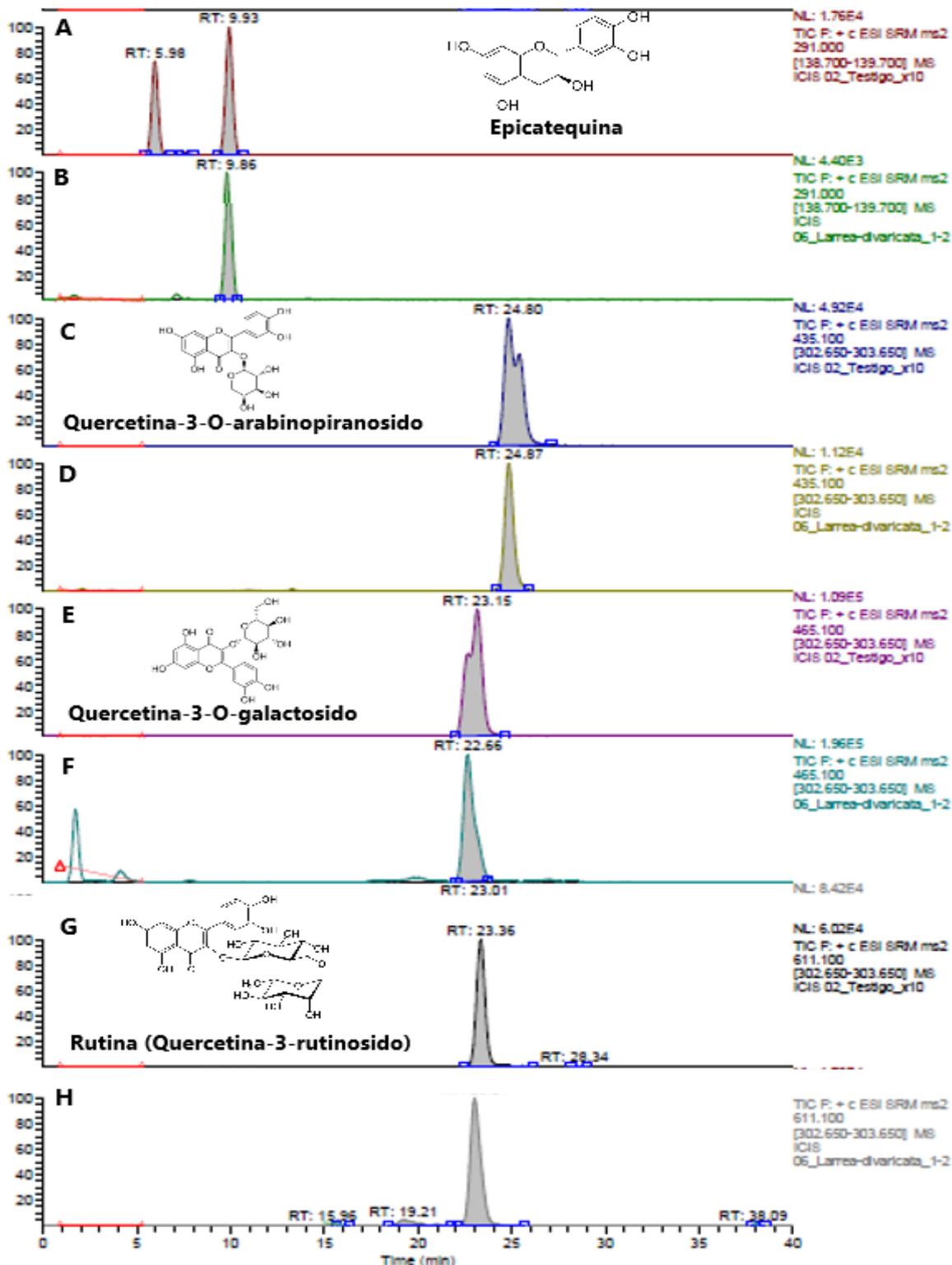


Figura 11. Cromatograma de ExA en modo positivo para la detección de glicósidos flavonoides. A: testigo de Epicatequina, B: ExA, C: testigo de Quercetina-3-O-arabinopiranosido, D: ExA, E: testigo de Quercetina-3-O-galactosido, F: ExA, G: testigo de Rutina, H: ExA.

RESULTADOS

En modo negativo, se detecta la presencia de ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido nordihidroguayarático (Figura 12).

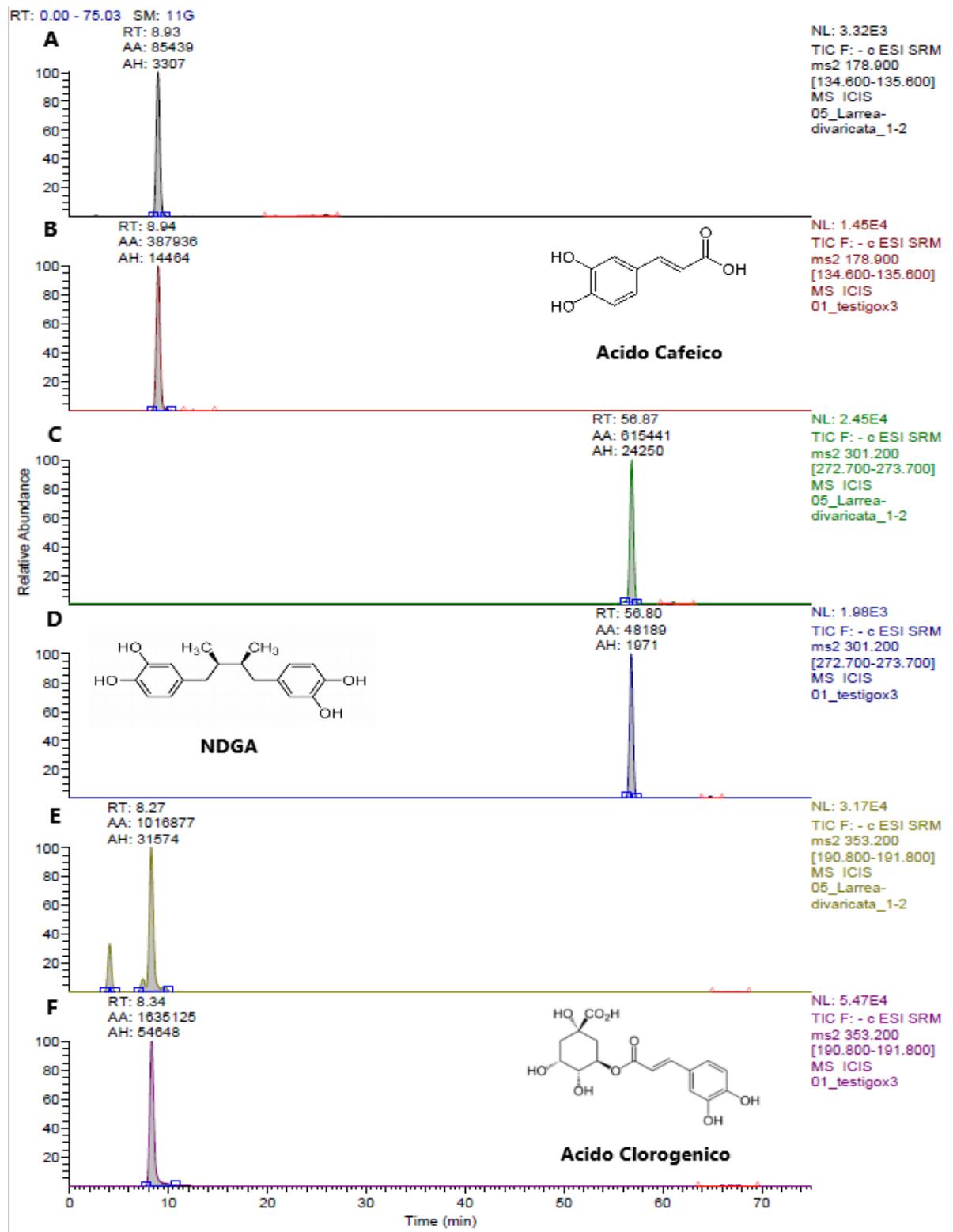


Figura 12. Cromatograma de ExA en modo negativo para la detección de ácidos fenólicos.

A: ExA, B: Testigo de Acido Cafeico, C: ExA, D: Testigo de NDGA, E: ExA, F: Testigo de Acido Clorogénico.

4.1.4. Composición nutricional y mineral de ExA.

Para completar el conocimiento del extracto en cuanto a su composición química, se determinó la composición de nutrientes y minerales. Se adjuntan los resultados en la Tabla 5. Se puede apreciar que casi el 50% del extracto está conformado por fibra dietaria y la ausencia esperable de lípidos al tratarse de una extracción acuosa.

COMPOSICION NUTRICIONAL [mg/g ExA]	
Fibra Dietaria Total	475 ± 12
Cenizas	201 ± 1,0
Carbohidratos	199,0
Proteinas	79 ± 0,00
Humedad	46,0 ± 1,0
Lipidos	ND
COMPOSICION MINERAL [ug/g ExA]	
Potasio	39.320 ± 211
Calcio	2.290 ± 120
Magnesio	161 ± 13
Sodio	148 ± 2
Zinc	21 ± 1
Hierro	10 ± 1
Cobre	4 ± 0,0

Tabla 5. Composición nutricional y mineral de ExA.

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres determinaciones.

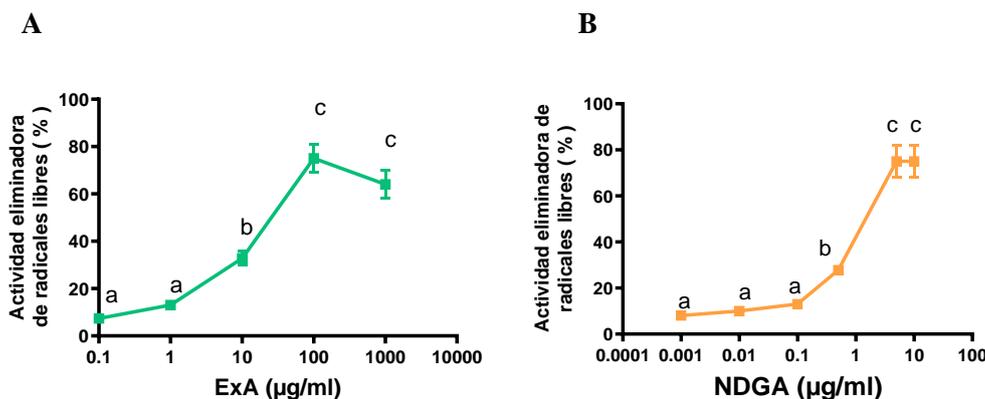
4.2. Actividad antioxidante general de ExA y NDGA

En primer lugar, se determinó la actividad antioxidante general de ExA y NDGA a través de diferentes métodos “in vitro” que permiten evaluar diferentes mecanismos de acción y se calculó las CE₅₀, para ponderar la participación del NDGA en la acción del extracto. Es decir, si dicha actividad se debía a la presencia exclusiva de NDGA en el extracto o a la sinergia entre NDGA y otros compuestos o a la presencia de otros compuestos diferentes al NDGA. Cabe remarcar que en todos los experimentos las concentraciones ensayadas de NDGA corresponden a las concentraciones en que se encuentra presente en el extracto.

4.2.1. Actividad eliminadora de radicales libres.

Este método evalúa la capacidad del extracto de reducir radicales libres (en este caso el radical DPPH) a través de la donación de electrones. Se ensayaron diferentes concentraciones de ExA, NDGA y Vitamina C (1000µg/ml) como control positivo antioxidante que mostro una actividad máxima del 83.3%. La respuesta máxima de ExA y de NDGA no difiere significativamente de la respuesta de la vitamina C (Figura 13 A y B).

En ambos casos se observa actividad eliminadora de radicales libres en relación directa con la concentración. Por otro lado, se determinaron las CE₅₀ de ExA y NDGA, que se muestran en la Figura 13 Tabla inserta. En la concentración efectiva media de ExA (13,2±1,5 µg/ml) según cuantificación por HPLC hay presente 0,039 µg/ml de NDGA, que presentó una actividad de 13,5 %.



	ExA	NDGA
Respuesta Máxima	75,1%	75,5%
CE₅₀ (µg/ml)	13,2 ± 1,5	0,81 ± 0,05**

Figura 13. Actividad eliminadora de DPPH del ExA (A) y NDGA (B).

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres experimentos o más realizados por triplicado. Además, se calcularon los valores de CE₅₀ a través del método de Alexander. a,b,c significativamente diferentes entre sí de acuerdo a prueba de ANOVA+ Tukey. *p<0.05, **p<0.01 diferencias significativas entre CE₅₀ de ExA y CE₅₀ de NDGA de acuerdo con la prueba T de Student.

ExA presentó actividad eliminadora de radicales libres en relación con la concentración y su actividad se debió a la acción de NDGA y de otros compuestos diferentes al mismo.

4.2.2. Inhibición de la peroxidación lipídica.

Los siguientes métodos determinan especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como lo es el malondialdehído, el cual proviene de la peroxidación lipídica de ácidos grasos. Se emplearon dos fuentes de lípidos diferentes: el ácido linoleico y yema de huevo, rica en fosfolípidos. En ambos casos los resultados se expresan como inhibición de la peroxidación lipídica (formación de malondialdehído (%)) calculado en relación al control).

4.2.2.1. Inhibición de la formación de TBARS del ácido linoleico

La oxidación del ácido linoleico se desencadenó por calor a 37°C. Se ensayaron diferentes concentraciones de ExA y NDGA observándose inhibición en la formación de TBARS en relación directa con la concentración. También se ensayó Vitamina C como control positivo antioxidante en una concentración de 1000 µg/ml observándose una actividad del 63%.

La respuesta máxima obtenida con el extracto (73%) fue mayor que la respuesta máxima obtenida con el NDGA (50%)(Figura 14 A y B). Las CE₅₀ de ExA y NDGA se muestran en la Figura 14 Tabla inserta. En la concentración efectiva media de ExA (26,9 ±2 µg/ml) según cuantificación por HPLC hay presente 0,080 µg/ml de NDGA, que presentó una actividad de 14,1 %.

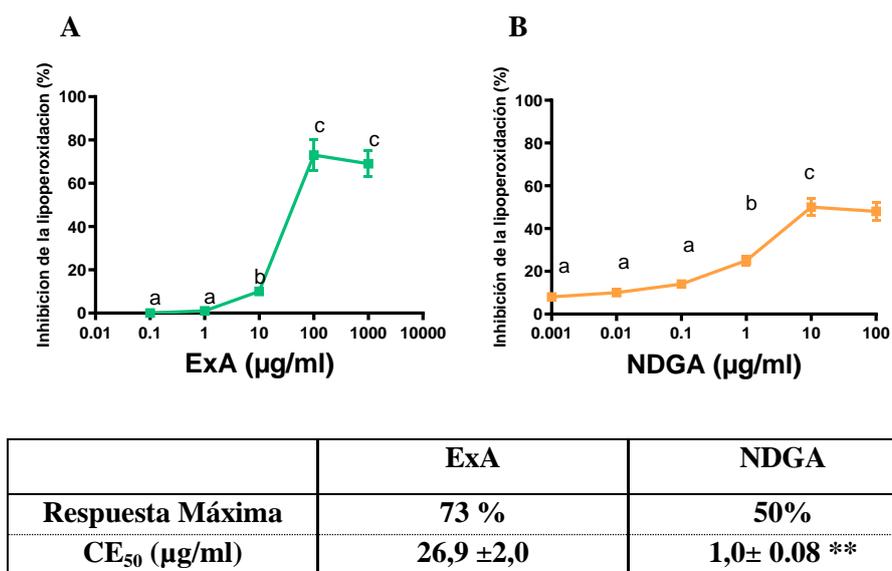


Figura 14. Actividad inhibitoria de ExA(A) y NDGA(B) sobre la peroxidación del ácido linoleico.

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres experimentos o más realizados por triplicado. Además, se calcularon los valores de CE₅₀ a través del método de Alexander para ExA y NDGA. a,b,c significativamente diferentes entre sí de acuerdo a prueba de ANOVA + Tukey. **p<0.01 diferencias significativas entre CE₅₀ de ExA y CE₅₀ de NDGA de acuerdo con la prueba T de Student.

ExA presentó actividad preventiva en la oxidación de ácido linoleico y su actividad se debió a la acción de NDGA y de otros compuestos diferentes al mismo.

4.2.2.2. Inhibición de la formación de TBARS de yema de huevo

La oxidación de los fosfolípidos de la yema de huevo se desencadenó en presencia de sulfato de hierro a 37°C. Se utilizó butilhidroxitolueno (BHT) como control positivo antioxidante en una concentración de 10mg/ml con una actividad de 58,8% de inhibición.

El ExA presentó una inhibición significativa de la formación de TBARS de yema de huevo en relación directa con la concentración. El NDGA también inhibió la formación de TBARS, pero sin guardar relación significativa con las concentraciones, por otro lado, los porcentajes de inhibición fueron muy bajos del orden del 4-22% (Figura 15 A y B). Por cuestiones técnicas referentes al método no se pudo aumentar las concentraciones de ExA y NDGA hasta lograr la respuesta máxima, por lo tanto, para el cálculo de CE_{50} se consideró una hipotética inhibición máxima del 100%.

En la concentración efectiva media de ExA ($1296,6 \pm 100$) según cuantificación por HPLC hay presente $3,90 \mu\text{g/ml}$ de NDGA, que presentó una actividad de 7,75%.

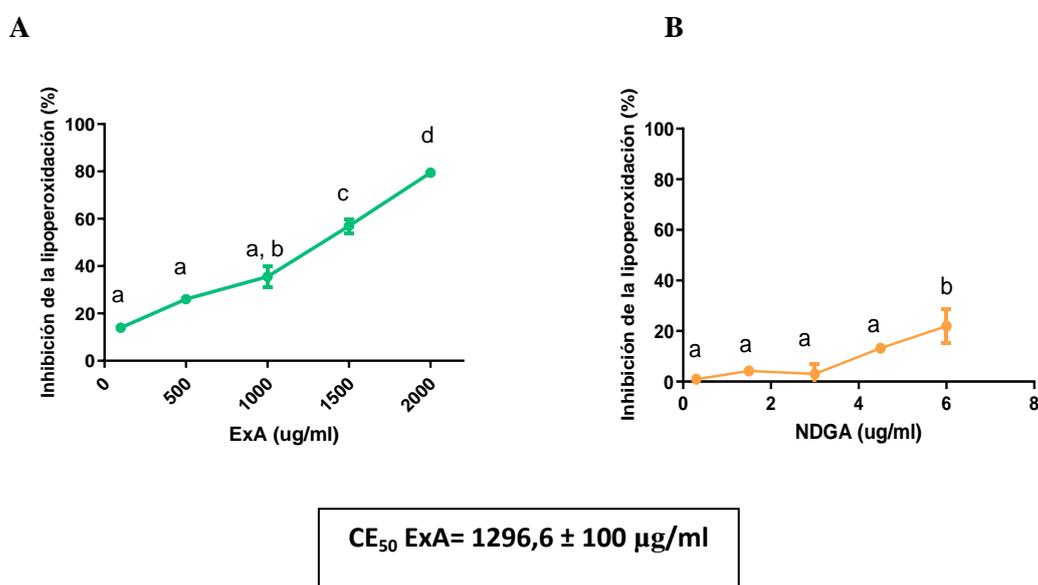


Figura 15. Inhibición de la peroxidación lipídica de yema de huevo por ExA (A) y NDGA (B).

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de tres experimentos o más realizados por triplicado. Además, se calcularon los valores de CE_{50} a través del método de Alexander. a,b,c,d significativamente diferentes entre sí de acuerdo con la prueba de ANOVA + Tukey.

ExA presentó actividad preventiva en la oxidación de fosfolípidos del huevo y su actividad se debió a la acción de NDGA en sinergia con otros compuestos

4.2.3. Interferencia con metales (Poder reductor)

Como puede observarse en la Figura 16 A, ExA presentó actividad reductora de metales en función directa con las concentraciones, mientras el NDGA presentó un efecto casi despreciable. Se considera una absorbancia de 2 como el máximo a considerar sin cometer errores de lectura, por lo que 2 fue considerada la respuesta máxima de ExA. En la hipotética concentración efectiva media de ExA ($250 \pm 10 \mu\text{g/ml}$) según cuantificación por HPLC hay presente $0,75 \mu\text{g/ml}$ de NDGA, que casi no presentó actividad.

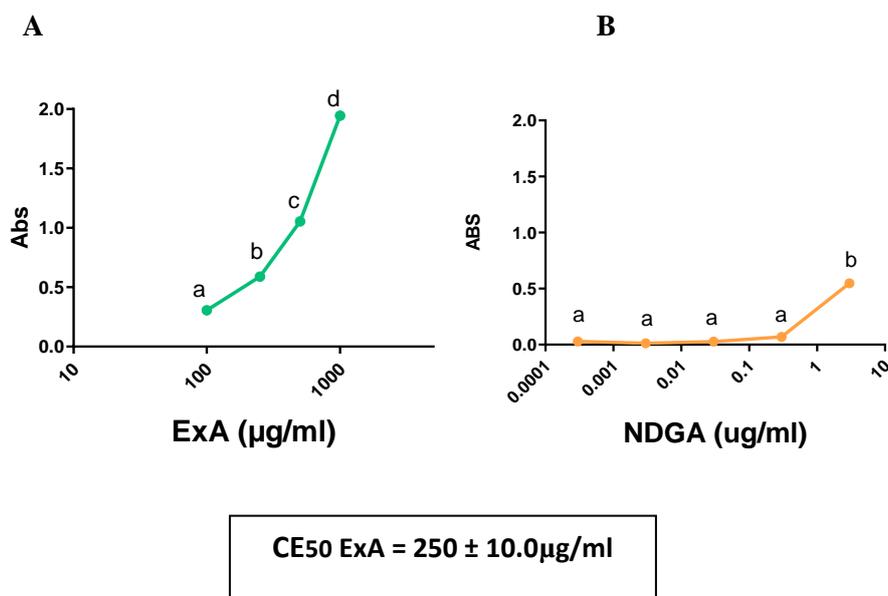


Figura 16. Determinación del Poder Reductor de metales de ExA y NDGA.

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de tres experimentos o más realizados por triplicado. Además, se calculó el valor de CE_{50} a través del método de Alexander. a,b,c,d significativamente diferentes entre sí de acuerdo con la prueba de ANOVA + Tukey.

ExA presentó actividad reductora de metales y su actividad se debió a compuestos diferentes al NDGA.

4.2.4. Actividad inhibidora de AGE's

En este caso se evaluó la acción inhibitoria del ExA y NDGA ante la formación de los Productos de Glicación Avanzada (AGE's). La producción endógena de dichos productos se ve incrementada en circunstancias de estrés oxidativo como pueden ser las enfermedades metabólicas y según el tipo de cocción los alimentos pueden ser fuentes de AGE's exógena. Dado que la dieta es una de las fuentes más importantes de AGE's se adaptó el método usando huevo procesado por fritura en aceite como sustrato de la glicación. Se cuantificaron los AGE's totales en ausencia (control positivo de oxidación) y presencia de ExA (100, 1000 y 10000 $\mu\text{g/ml}$) y 30 $\mu\text{g/ml}$ de NDGA.

Podemos observar que ExA fue capaz de disminuir significativamente la formación de los productos de glicación en el huevo sin guardar una relación directa con las concentraciones. Por otro lado, el

NDGA, ensayado en la concentración presente en 10000 µg/ml de ExA, produjo una disminución no significativa respecto al control (Figura 17 B). La Figura 17 A muestra la curva de calibración (realizada a partir de las absorbancias de concentraciones conocidas de AGE's), utilizada para calcular las concentraciones de AGE's y su coeficiente de correlación.

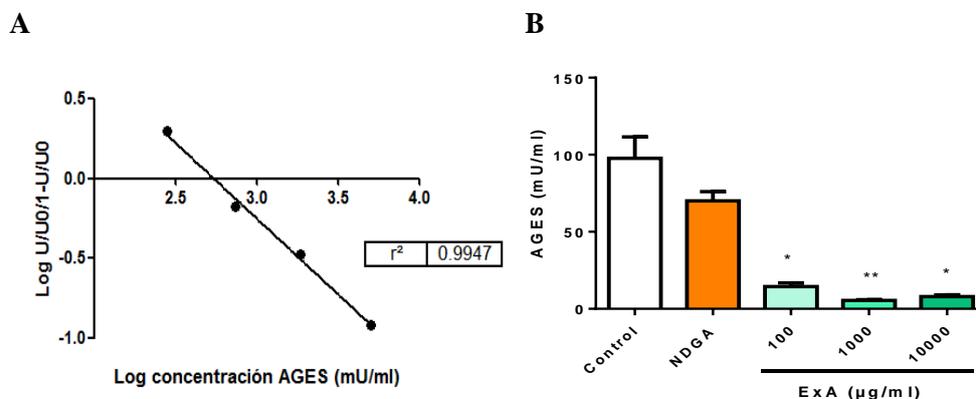


Figura 17. Efecto preventivo de ExA y NDGA sobre la formación de AGE's en huevo procesado.

Los valores de AGE's totales fueron calculados por interpolación en la curva de calibración, utilizando un KIT de ELISA competitivo directo (A). Los resultados corresponden a la Media ± ESM de tres determinaciones valoradas por triplicado. ** p<0,01 diferencias significativas respecto al control según prueba estadística de ANOVA+ Dunnett.

ExA presentó actividad preventiva en la formación de AGEs y su actividad se debió en parte al NDGA, pero en sinergia con otros compuestos.

4.2.5. Actividad similar enzimas antioxidantes.

Con esta metodología se evaluó la capacidad de ExA para simular la actividad del sistema antioxidante enzimático conformado por SOD, CAT y Px. Este sistema es el responsable de la ruta de detoxificación del anión superóxido y del peróxido de hidrogeno originados durante el metabolismo, como se comentó en la introducción.

El extracto presentó actividades similar enzimáticas Px, CAT y SOD. Como se puede observar en la Figura 18 A, ExA presentó actividad similar SOD mostrando dos efectos máximos, uno a bajas concentraciones (1 µg/ml) y otro a altas (1000 µg/ml). Además, presentó actividad CAT en relación directa con las concentraciones ensayadas y alcanzando una actividad máxima con la concentración de 100 µg/ml (Figura 18 C), mientras que la actividad Px del extracto también guardó una relación directa con las concentraciones estudiadas, pero a partir de los 10µg/ml (Figura 18 E).

Por otro lado, se estudió esta actividad específica con NDGA. Este compuesto presentó una respuesta bifásica en relación con la actividad SOD donde concentraciones bajas produjeron oxidación de la adrenalina (de ahí los valores negativos de actividad SOD), mientras que concentraciones mayores, presentaron actividad enzimática en relación directa con la concentración (Figura 18 B).

También, el NDGA presentó actividad similar CAT en relación directa con concentraciones bajas y en relación inversa con concentraciones más altas, logrando de esta forma una respuesta máxima con

RESULTADOS

la concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 18 D). En cuanto a la actividad Px, el NDGA ejerció actividad símil Px en concentraciones mayores de 1 $\mu\text{g/ml}$, a partir de esta concentración se observó un efecto relacionado en forma directa con las concentraciones (Figura 18 F)

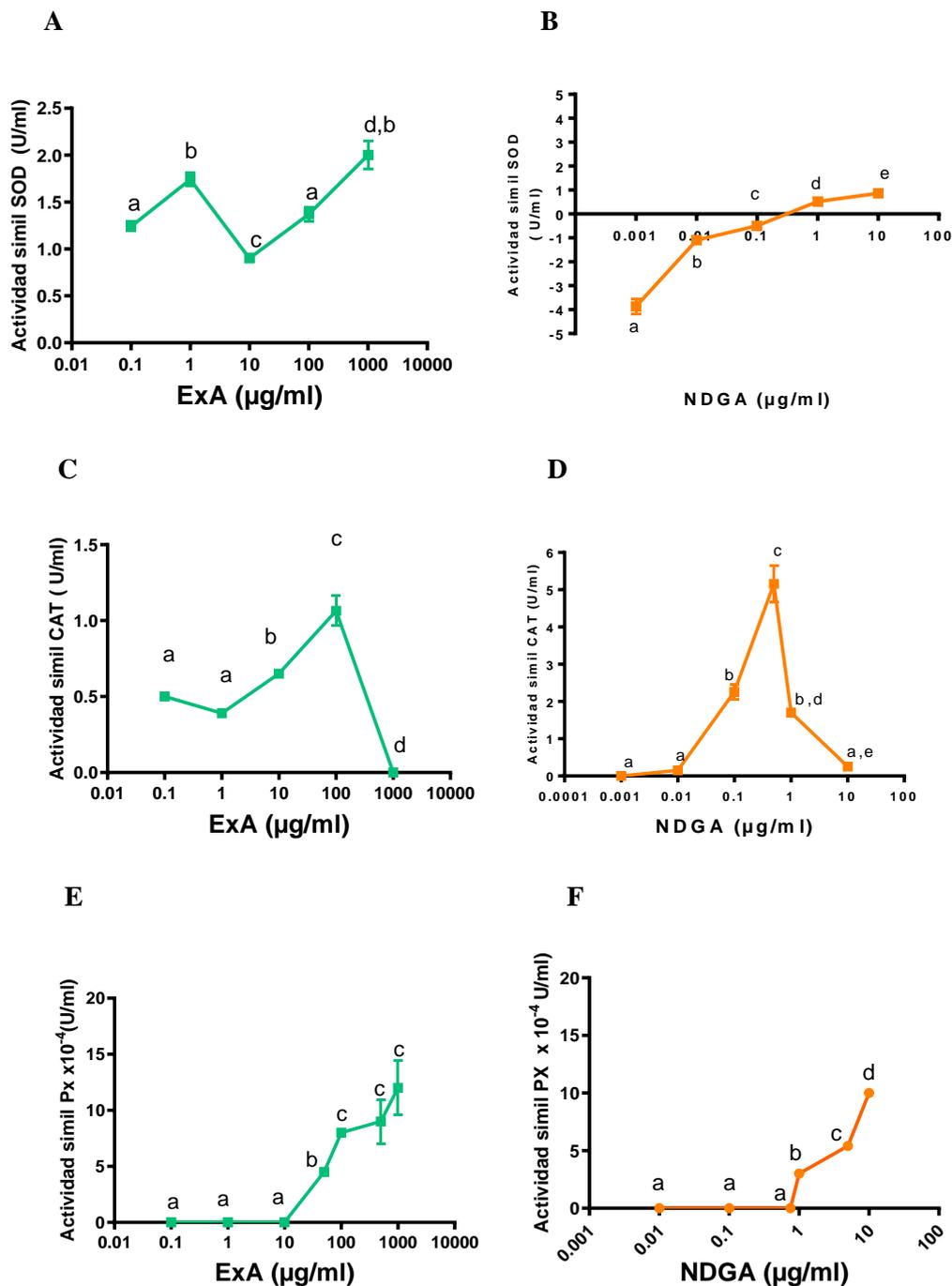


Figura 18. Actividad enzimática “per se” del ExA y NDGA.

Actividad símil Peroxidasa (A y B), símil Catalasa (C y D) y símil Superóxido Dismutasa (E y F). Los resultados corresponden a la Media \pm ESM de tres determinaciones valoradas por triplicado. a,b,c significativamente diferentes entre sí de acuerdo a prueba de ANOVA + Tukey.

Con respecto a la actividad SOD, ExA presentó dos respuestas máximas. Una a 1 $\mu\text{g/ml}$, con una respuesta máxima de 1,6 U/ml, donde la concentración de NDGA presente en ExA es de 0,003 $\mu\text{g/ml}$

RESULTADOS

y presenta efecto prooxidante. Por lo tanto, el NDGA no sería el compuesto involucrado en la actividad SOD de ExA para esa concentración. En la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$, ExA presentó otra actividad máxima (2 U/ml) y la concentración de NDGA presente en esa concentración de ExA fue de 3 $\mu\text{g/ml}$ que solo produjo una actividad de 0,5 U/ml.

1 $\mu\text{g/ml}$ ExA _____ 1,6 U/ml (respuesta máxima)



0,003 $\mu\text{g/ml}$ NDGA _____ pro-oxidante

1000 $\mu\text{g/ml}$ ExA _____ 2 U/ml (respuesta máxima)



3 $\mu\text{g/ml}$ NDGA _____ 0,5 U/ml

ExA presento actividad símil SOD y el NDGA podría estar involucrado juntamente con otros compuestos en esta respuesta.

Para la actividad CAT, la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ExA produjo una actividad de 1,06 U/ml (respuesta máxima). La cantidad de NDGA presente en esa concentración (0,3 $\mu\text{g/ml}$) produjo una actividad de 5,5 U/ml.

1000 $\mu\text{g/ml}$ ExA _____ 1,06U/ml (respuesta máxima)



3 $\mu\text{g/ml}$ NDGA _____ 5,5 U/ml

ExA presento actividad símil CAT y el NDGA es el compuesto responsable pero además el extracto presenta otros compuestos que podrían oponerse a este efecto

Para la actividad Px, la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de ExA produjo una actividad de 15×10^{-4} U/ml (respuesta máxima) y la cantidad de NDGA presente en esa concentración (3 $\mu\text{g/ml}$) produjo una actividad de 5×10^{-4} U/ml.

1000 $\mu\text{g/ml}$ ExA _____ 15×10^{-4} U/ml (respuesta máxima)



3 $\mu\text{g/ml}$ _____ 5×10^{-4} U/ml

ExA presentó actividad símil Px y el NDGA y otros compuestos serían los responsables de la misma.

4.2.6. Efecto sobre la activación de enzimas antioxidantes

Se estudió también el efecto de ExA y NDGA sobre la velocidad de eliminación de H₂O₂ (Px y CAT) y sobre la velocidad de la inhibición de oxidación de la adrenalina (SOD) “in vitro” enfrentado una concentración de ExA (500 µg/ml) y la correspondiente concentración de NDGA (1,5 µg/ml) con concentraciones fijas de enzimas Px, CAT y SOD estándar en presencia de diferentes concentraciones de sustrato (H₂O₂ o adrenalina). También se analizó el efecto de ExA (500 µg/ml) y NDGA (1,5 µg/ml) sobre diferentes concentraciones de enzimas en presencia de una concentración establecida de los sustratos.

Tanto ExA como el NDGA fueron capaces de aumentar la velocidad máxima de eliminación del H₂O₂ ejercida por la peroxidasa estándar (Figura 19 A). En la Figura 19 B se puede ver que tanto el extracto como el NDGA pudieron aumentar la velocidad de eliminación del H₂O₂ de diferentes actividades de la misma.

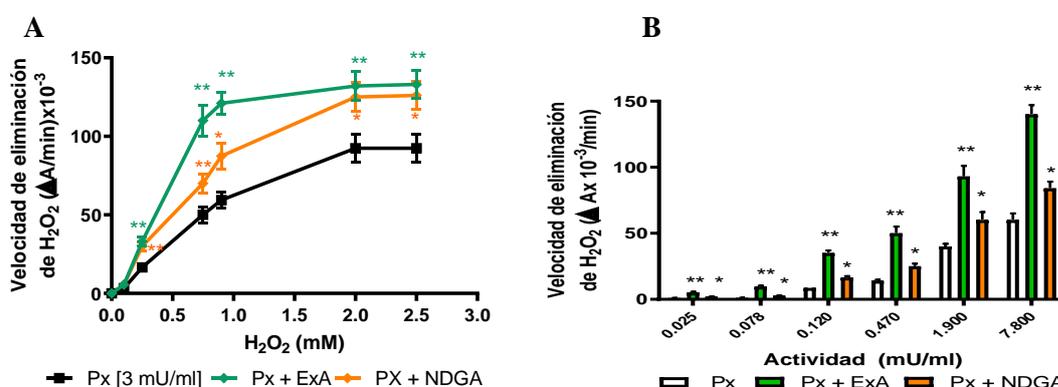


Figura 19. Efecto de ExA y NDGA sobre la velocidad máxima de eliminación del H₂O₂ de peroxidasa estándar.

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado. *p<0,05; **p<0,01 diferencias significativas con respecto a Px (sola) según ANOVA + prueba de Dunnett.

Cuando se analizó el efecto del extracto y del NDGA sobre la actividad SOD, se vio que, nuevamente el extracto (500 µg/ml) y el NDGA (1,5 µg/ml) aumentaron significativamente la velocidad máxima en la inhibición de la oxidación de la adrenalina (Figura 20 A). Más aún, tanto el extracto como el NDGA fueron capaces de aumentar la actividad inhibitoria de la oxidación en presencia de diferentes actividades de enzima estándar (Figura 20 B).

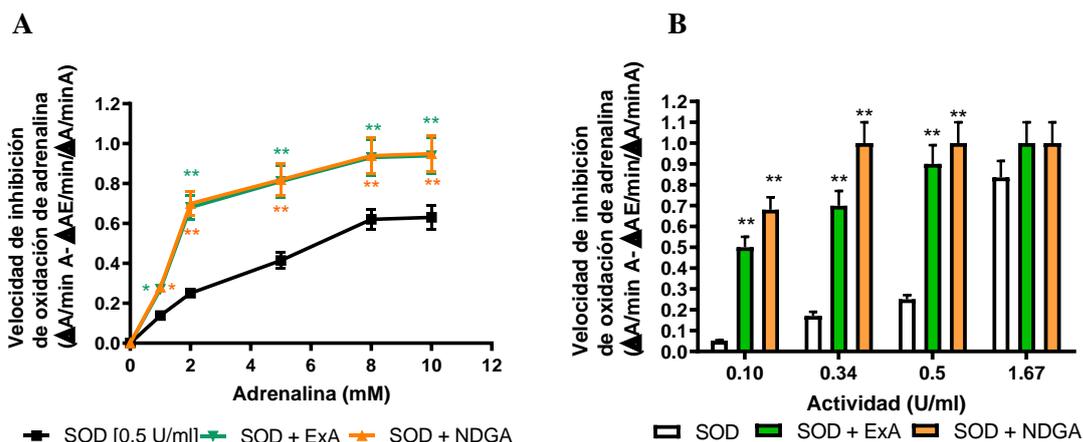


Figura 20. Efecto de ExA y NDGA sobre la velocidad máxima de inhibición de la oxidación de adrenalina de SOD estándar.

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado. *p<0,05; **p<0,01, diferencias significativas con respecto a SOD (sola), según ANOVA + prueba de Dunnett.

Por último, con respecto a la actividad CAT, tanto el extracto como el NDGA disminuyeron la velocidad máxima de eliminación del H₂O₂ (Figura 21 A). Además, ambos fueron capaces de disminuir la eliminación del H₂O₂ en presencia de diferentes actividades enzimáticas de Catalasa estándar (Figura 21 B).

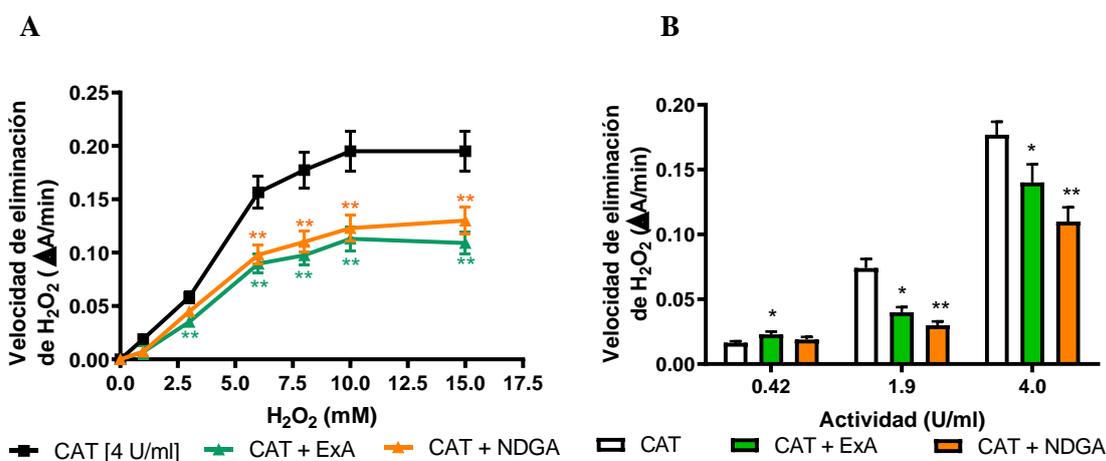


Figura 21. Efecto del extracto y del NDGA sobre la velocidad máxima de eliminación del H₂O₂ de catalasa estándar.

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres determinaciones realizadas por triplicado. *p<0,05; **p<0,01, diferencias significativas con respecto a CAT (sola), según ANOVA + prueba de Dunnett.

ExA aumento significativamente la velocidad máxima de Px y SOD estándar mientras que disminuyo la velocidad máxima de CAT. El NDGA sería el responsable de la acción sobre SOD y sobre la CAT, pero otros compuestos también estarían involucrados en la acción sobre Px.

4.2.7. Actividad protectora de lipoproteínas plasmáticas

Dado que el estrés oxidativo desencadena la oxidación de lípidos y proteínas y que se demostró la protección sobre los lípidos, se decidió estudiar el efecto antioxidante de ExA y NDGA sobre las lipoproteínas plasmáticas debido a la importancia de las mismas durante la aterogénesis. Para estos ensayos se purificó HDL y LDL de suero humano por ultracentrifugación diferencial y se enfrentó a la HDL a radicales libres hidrosolubles (AAPH) y a un generador de peroxinitritos (SIN-1); y a la LDL a oxidación inducida por CuSO₄.

4.2.7.1. Efecto de ExA y NDGA sobre la función antioxidante de HDL ante estrés oxidativo y nitrosativo inducido.

Para evaluar la funcionalidad de la HDL ante estas circunstancias se determinó la actividad de la enzima Paraoxonasa-1. Esta enzima está asociada a la HDL y tiene acción antioxidante sobre la LDL por lo que juega un papel central en la regulación de la aterogénesis.

En la figura 22A se puede observar que el AAPH disminuyó significativamente la actividad PON-1 y que tanto ExA como NDGA no fueron capaces de revertir significativamente el efecto de AAPH.

En la figura 22B se observa que SIN-1 también disminuyó la acción PON-1 y que solo las concentraciones más bajas de ExA y NDGA logran revertir este efecto.

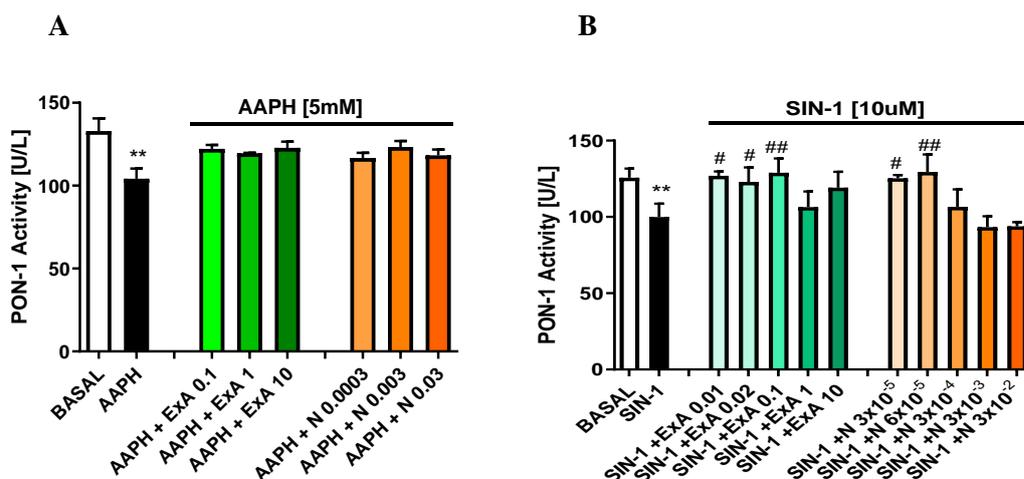


Figura 22. Efecto protector de ExA y NDGA sobre HDL ante estrés oxidativo (A) y nitrosativo (B) inducido.

N: NDGA. Las concentraciones de ExA y NDGA se expresan en µg/ml. La actividad PON-1 fue determinada por la capacidad de la enzima de catalizar la hidrólisis del fenilacetato. Los resultados representan la Media ± ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. **p<0.01 diferencias significativas respecto al BASAL según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0.05, ##p<0.01; diferencias significativas respecto a AAPH (A) o SIN-1 (B) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

Concentraciones bajas de ExA revirtieron la disminución de la actividad PON-1 de la HDL provocada por SIN-1. El NDGA estaría involucrado en la acción de las concentraciones más bajas del extracto.

4.2.7.2. Efecto de ExA y NDGA sobre la estructura de HDL ante estrés nitrosativo inducido por SIN-1

Para analizar la posible causa de la disminución de la actividad PON-1 generada por SIN-1 se realizó una corrida electroforética en SDS-PAGE según Laemmli de la HDL en ausencia (Control) y presencia de SIN-1, ExA y NDGA seguida de un inmunoblotting con anticuerpos anti-ApoA1 para analizar la integridad de esta apoproteína (componente fundamental de la HDL).

En la siguiente figura se observa que efectivamente el SIN-1 modifica el perfil electroforético de la HDL provocando la aparición de nuevas bandas comparado con el control. Al analizar el inmunoblot se desprende que esas bandas corresponden a la ApoA-1 pero, teniendo en cuenta el peso molecular, corresponderían a dímeros y trímeros de la misma. Las dos concentraciones ensayadas de ExA logran disminuir la intensidad de estas bandas mientras que el NDGA solo lo logra en su concentración más alta.

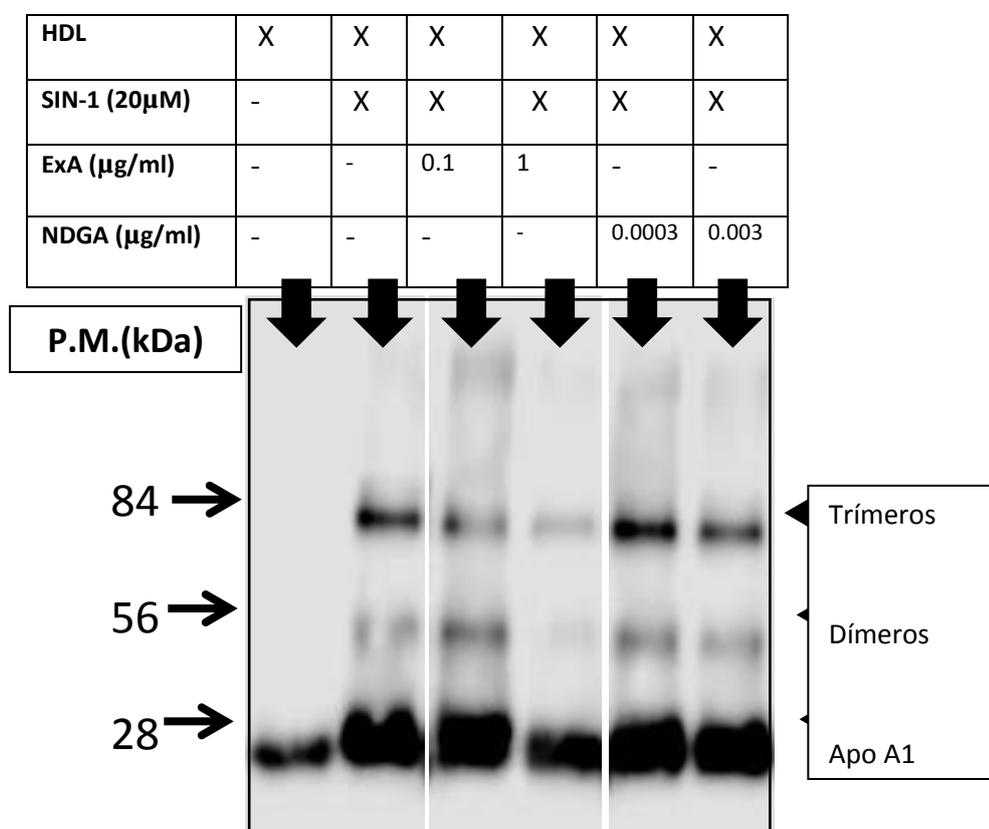


Figura 23. Efecto de ExA y NDGA sobre la estructura de HDL ante estrés nitrosativo inducido por Westernblot.

Realizado en un gel de 4-20% de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y posterior transferencia a una membrana de PVDF a 15 V por 35 minutos. Para la detección de ApoA-1 se utilizaron anticuerpos conjugado con HRP (Anti-ApoA-1 (HRP), 1:1.000 en 10% de NCS). Luego los blots fueron incubados con el reactivo ECL PLUS, desarrollados y escaneados en un scanner quimioluminiscente; y procesados con el software Image Studio.

ExA disminuyo la formación de dímeros y trímeros de la ApoA-1 durante la nitración de la HDL con SIN-1. El NDGA sería uno de los compuestos involucrados en esta acción.

4.2.7.3. Efecto de ExA y NDGA ante la oxidación de LDL inducida por Cu⁺⁺

En este caso, se determinó la formación de TBARS en la LDL en presencia de CuSO₄ y se analizó el efecto protector de la lipoperoxidación de ExA y NDGA.

En la figura 24 se observa que el Cu⁺⁺ aumentó significativamente la producción de TBARS y que ExA revertió este fenómeno en las concentraciones de 0.1 y 1 µg/ml, llegando a los niveles basales con la concentración más baja. Por su parte el NDGA, demostró una respuesta bifásica logrando revertir el aumento de TBARS provocado por Cu⁺⁺ con la concentración más baja y la más alta.

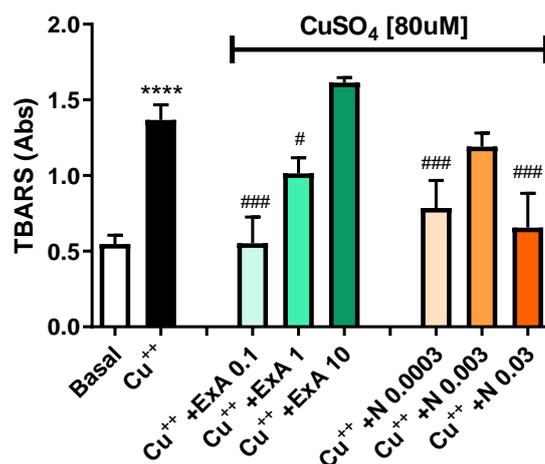


Figura 24. Efecto de ExA y NDGA sobre la formación de TBARS en LDL sometida a oxidación con Cu⁺⁺.

Las concentraciones de ExA y NDGA se expresan en µg/ml. Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres experimentos o más realizados por triplicado. ****p<0.0001 diferencias significativas respecto al BASAL según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0.05, ##p<0.01; diferencias significativas respecto a Cu⁺⁺ según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

ExA revertió el aumento en la formación de TBARS en LDL causado por Cu⁺⁺ en relación inversa con su concentración. El NDGA estaría involucrado en la actividad de las concentraciones más bajas del extracto

4.3. Actividad antioxidante sobre Macrófagos bajo estrés oxidativo inducido por glucosa.

Después de haber comprobado la actividad antioxidante de ExA y NDGA en modelos no biológicos se decidió corroborar esta actividad en modelos biológicos en presencia de estresores oxidantes fisiológicos como la glucosa. Por lo tanto, se comenzó estudiando los efectos de ExA y NDGA en presencia de diferentes concentraciones de glucosa sobre una línea de macrófagos (RAW 264.7), teniendo en cuenta la importancia de estas células en fenómenos inflamatorios de patologías que cursan con estrés oxidativo.

4.3.1. Efecto de ExA y NDGA sobre la proliferación celular.

Con el fin de elegir la concentración de glucosa que pudiera afectar la proliferación de los macrófagos para luego estudiar el efecto de ExA y de NDGA bajo estas condiciones, los macrófagos fueron cultivados en presencia de concentraciones crecientes de glucosa: 5,5 (Basal), 11, 55 y 110 mM, evaluándose la proliferación celular por la técnica de MTT.

Se puede observar en la Figura 25 que la glucosa disminuyó significativamente la proliferación celular en las concentraciones de 11, 55 y 110 mM. **Los valores obtenidos con glucosa 55 y 110 mM no fueron significativamente diferentes entre ellos, por lo tanto, se decidió analizar el efecto de ExA y NDGA en presencia de las concentraciones de 11 y 55 mM.**

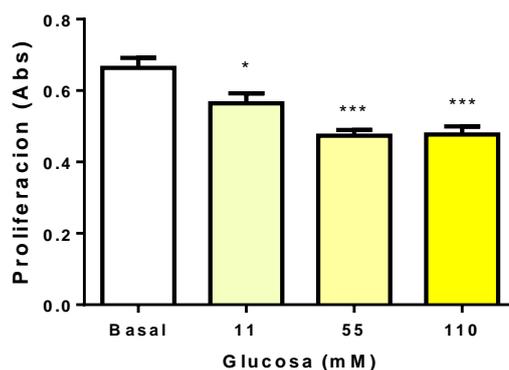


Figura 25. Efecto de la glucosa sobre la proliferación de macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas 24hs en presencia de las diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados representan la Media \pm ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado.

* $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ diferencias significativas respecto al Basal (sin glucosa agregada) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

Por otro lado, se analizó el efecto de ExA y NDGA sobre la proliferación de macrófagos en condiciones basales y en presencia de las concentraciones de glucosa seleccionadas en el experimento anterior y que fueron capaces de modificar la proliferación celular. Las concentraciones de ExA ensayadas (0,1; 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$) no modificaron la proliferación en condiciones basales (Figura 26A) pero en presencia de glucosa 11 y 55 mM, ExA fue capaz de revertir la disminución de la proliferación, inducida por ambas concentraciones de glucosa. Con la concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de ExA la reversión fue significativa y correspondió a un 30% en presencia de glucosa 11 mM y un 46% en presencia de glucosa 55 mM. Si bien se observó una tendencia a revertir el efecto de glucosa 11 mM con las concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ de ExA, solo fue significativo el efecto en presencia de glucosa 55 mM.

RESULTADOS

Por su parte, el NDGA disminuyó la proliferación celular basal, en todas las concentraciones presentes en el extracto (Figura 26B) y fue solo capaz de revertir el efecto de glucosa 11 mM, en la concentración de 3×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$, de forma significativa.

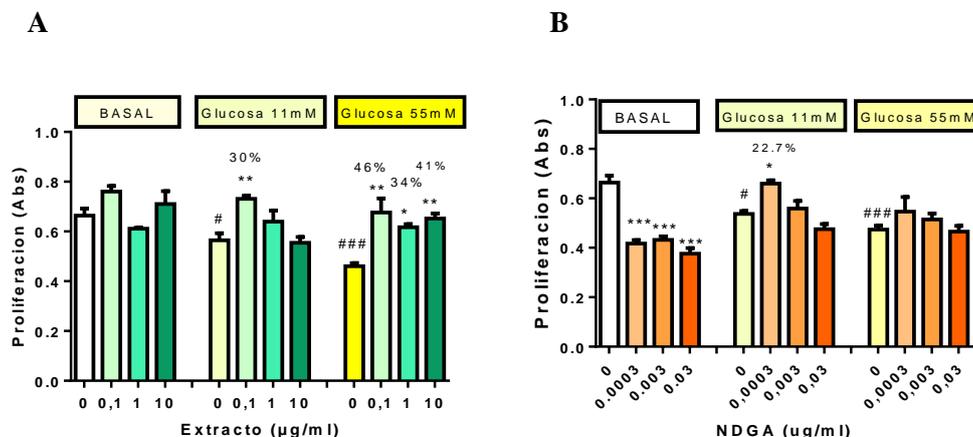


Figura 26. Efecto de ExA (A) y NDGA (B) en la respuesta de la glucosa sobre la proliferación de macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas durante 24hs. Los resultados representan la Media \pm ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. Se expresa además el porcentaje de aumento de proliferación sobre la barra, cuando corresponde. * $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ diferencias significativas respecto a cada concentración de glucosa (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett. # $p < 0,05$; ### $< 0,001$ diferencias significativas respecto al Basal (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

ExA logro revertir el efecto de inhibición de la proliferación celular inducida por ambas concentraciones de glucosa. Por su parte, el NDGA inhibió la proliferación en condiciones basales y solo logró revertir el efecto ante un aumento moderado de glucosa. Otros compuestos diferentes al NDGA estarían involucrados en el efecto de ExA

4.3.2. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de óxido nítrico.

Dado que el óxido nítrico está involucrado en el control de la proliferación celular y además es una especie reactiva del nitrógeno relacionada con el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, se analizaron los efectos de ExA y NDGA sobre los niveles de ON en presencia de diferentes concentraciones de glucosa para estudiar su participación en los efectos mostrados sobre la proliferación celular.

En la Figura 27 se observa que la glucosa aumentó significativamente los niveles de ON en las concentraciones en las que disminuyó la proliferación celular.

Por otra parte, en condiciones basales, ExA no modificó significativamente los niveles de ON (Figura 28A), pero revirtió significativamente el aumento en los niveles de ON inducidos por glucosa 11 y 55 mM, en todas las concentraciones ensayadas. El NDGA en condiciones basales aumentó los niveles de ON en la concentración de 0,03 $\mu\text{g/ml}$, mientras que todas las concentraciones ensayadas revirtieron significativamente el aumento en los niveles de ON inducidos por glucosa 11 y 55 mM. Este efecto guardó una relación inversa con las concentraciones evaluadas.

RESULTADOS

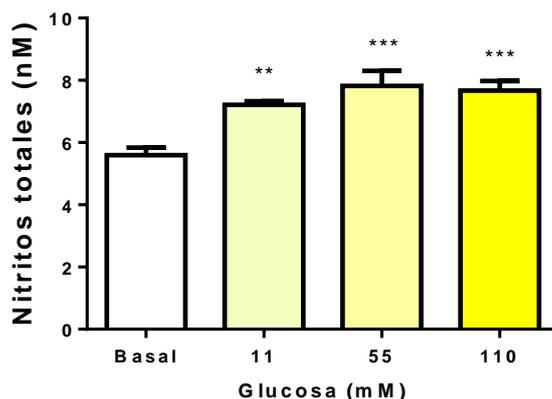


Figura 27. Efecto de la glucosa sobre la producción de óxido nítrico de macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas 24 hs en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados representan la Media \pm ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ diferencias significativas respecto al Basal (sin glucosa agregada) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

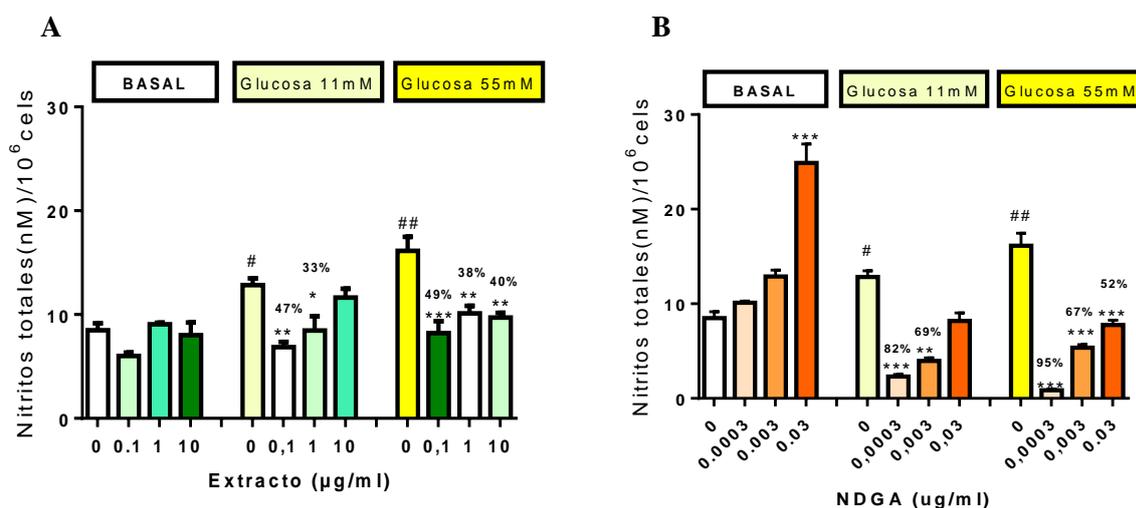


Figura 28. Efecto ExA (A) y NDGA (B) en la respuesta de la glucosa sobre la producción de ON en macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas durante 24hs. Los resultados representan la Media \pm ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. Se expresa además el porcentaje de disminución, sobre la barra, cuando corresponde. * $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ diferencias significativas respecto a cada concentración de glucosa (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett. # $p < 0,05$; ### $< 0,001$ diferencias significativas respecto al Basal (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

Tanto ExA como NDGA revirtieron el aumento en la producción de ON provocado por la glucosa. En este caso este efecto fue mayor con el NDGA que con ExA. Por lo tanto, el NDGA es uno de los compuestos involucrados en la acción del extracto y otros compuestos presentes en ExA estarían contrarrestando la actividad del NDGA.

4.3.3. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de ERO's.

La producción de ERO's fue determinada por citometría de flujo bajo ambas concentraciones de glucosa y en condiciones basales ya que podría estar involucrada en la disminución de la proliferación celular. Se evidencio un aumento significativo de estas especies ante el agregado de glucosa en el medio de cultivo celular. Además, se observó que la concentración de 1µg/ml ExA (Fig.29A) fue capaz de revertir el efecto de la glucosa 55 mM, en forma significativa; mientras disminuyó levemente el efecto de glucosa 11 mM, en forma no significativa. Por otro lado, la concentración relativa de NDGA (0.003µg/ml) potenció el efecto de la glucosa (Fig. 29B).

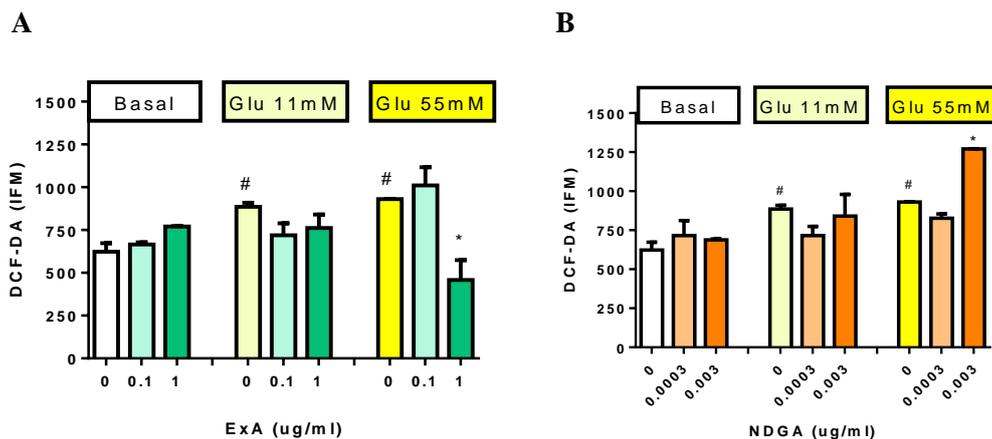


Figura 29. Efecto de la glucosa y ExA (A) y NDGA (B) sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO's) en macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas 24 hs. Los resultados representan la Media ± ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. *p<0,05; diferencias significativas respecto a cada concentración de glucosa (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0,05; diferencias significativas respecto al basal (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

ExA, en su concentración de 1µg/ml, logra revertir el aumento de la producción de ERO's provocado por la glucosa (55mM). El NDGA no estaría involucrado en esta acción.

4.3.4. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de TBARS.

Dado que las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, como el malondialdehído, son marcadores finales de la peroxidación de los fosfolípidos de membrana, que afectan la proliferación celular, se analizó el efecto de la glucosa, ExA y NDGA sobre la producción de las TBARS.

Se puede observar en la Figura 30 que el aumento de glucosa en el medio de cultivo produjo un aumento de los niveles de TBARS. Ambas concentraciones de ExA revirtieron, solamente, el efecto de glucosa (11mM). El NDGA no modificó significativamente la producción de TBARS en las concentraciones ensayadas, ante ninguna concentración de glucosa.

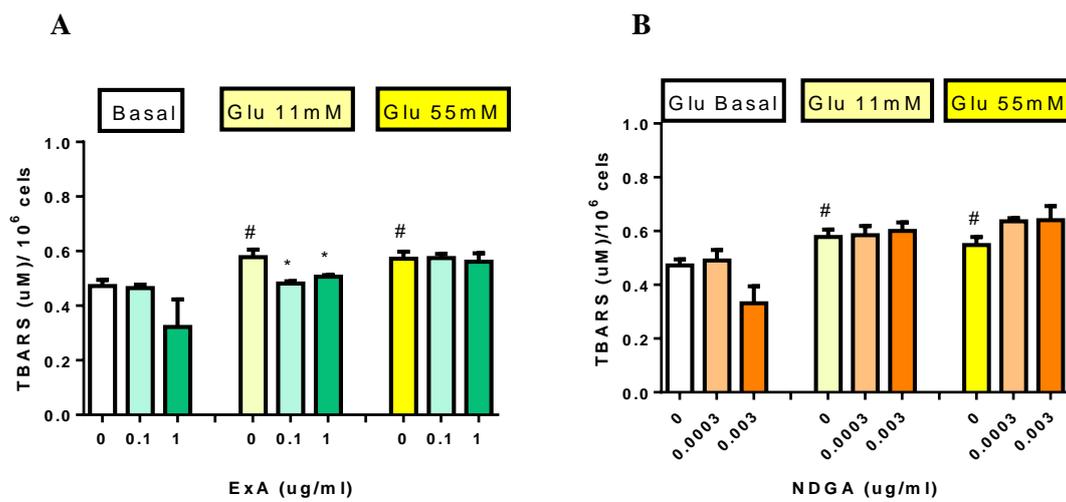


Figura 30. Efecto de la glucosa y ExA (A) y NDGA (B) sobre la producción de especies reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas 24 hs. Los resultados representan la Media ± ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. *p<0,05; diferencias significativas respecto a cada concentración de glucosa (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0,05; diferencias significativas respecto al basal (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

Las concentraciones ensayadas de ExA revirtieron el aumento en la producción de TBARS inducido por glucosa 11mM. El NDGA no estaría involucrado en esta acción.

4.3.5. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de TNF- α .

TNF- α pertenece al grupo de las citoquinas liberadas por las células del sistema inmune, que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria. La liberación de TNF- α produce, entre otras acciones, la liberación de ON en el endotelio vascular. Por ello, se analizaron los efectos de ExA y NDGA sobre los niveles de TNF- α ante una elevada concentración de glucosa para estudiar su relación con las actividades mostradas anteriormente.

En la figura 31 se puede observar el incremento en la producción de TNF- α en condiciones de elevada glucosa (55mM). Por su parte, ExA (Fig.31A) potenció dicho efecto en la concentración más baja, pero lo revirtió en la concentración más elevada. El NDGA no muestra efectos significativos sobre la producción de TNF- α (Fig.31B), ni en condiciones basales ni en presencia de glucosa.

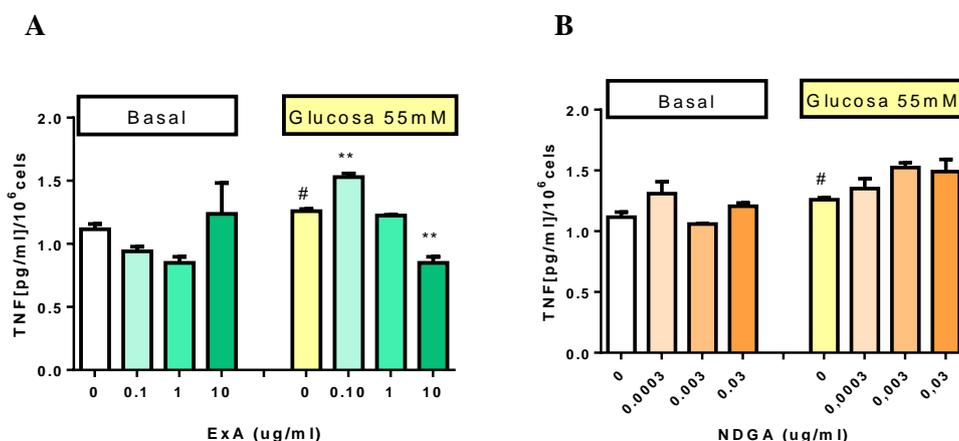


Figura 31. Efecto de la glucosa y ExA (A) y NDGA (B) sobre la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) en macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas 24 hs. Los resultados representan la Media \pm ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. *p<0,05; **<0,01; diferencias significativas respecto a cada concentración de glucosa (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0,05; diferencias significativas respecto al Basal (0) ANOVA+ Prueba de Dunnett.

ExA presentó una respuesta bifásica ante el aumento de la producción de TNF- α inducido por glucosa que no se corresponde con su contenido de NDGA.

4.3.6. Efecto de ExA y NDGA sobre la producción de Glutación reducido.

A continuación, se determinó la producción de GSH en los macrófagos ante la presencia de glucosa en el medio y se evaluó el efecto de ExA y NDGA bajo esta condición.

En la figura 32 se puede observar que la producción de GSH disminuyó ante un incremento moderado de glucosa (11mM). También, se observa que ambas concentraciones de ExA aumentaron dicha producción en condiciones basales y que la concentración más baja de ExA revirtió los efectos de la glucosa. Por su parte, el NDGA no modificó la producción basal, aunque revirtió el efecto de la glucosa 11mM en las dos concentraciones ensayadas y el de la glucosa 55mM en su concentración más alta.

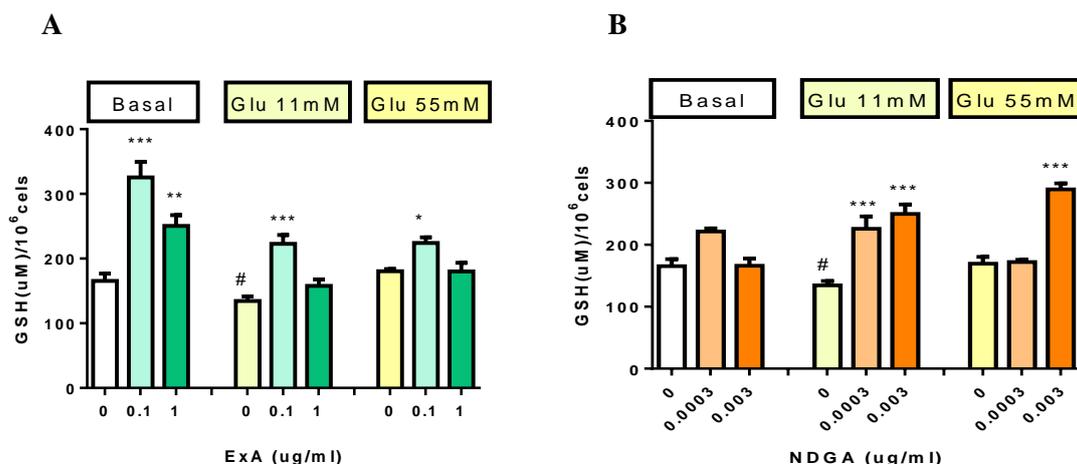


Figura 32. Efecto de la glucosa, ExA (A) y NDGA (B) sobre la producción de Glutación reducido (GSH) en macrófagos RAW.

Las células fueron incubadas 24 hs. Los resultados representan la Media ± ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado *p<0,05; **<0,01; ***<0,001 diferencias significativas respecto a cada concentración de glucosa (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0,05; diferencias significativas respecto al basal (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

ExA aumento la producción de GSH en condiciones basales y revirtió la disminución de los niveles de GSH producidos por alta glucosa. El NDGA parecería estar involucrado en este efecto.

4.3.7. Efectos sobre la citotoxicidad generada por estrés inducido por SIN-1 y AAPH.

Teniendo en cuenta los resultados observados en presencia de glucosa, a continuación se determinó el efecto de ExA y NDGA sobre la citotoxicidad de los macrófagos cuando son enfrentados a distintos estresores. Para ello se cultivaron las células en presencia de un estresor nitrosativo (SIN-1), un estresor oxidativo (AAPH) y una combinación de ambos.

En la figura 33, se observa que las tres condiciones aumentaron la citotoxicidad en los macrófagos con respecto al basal. La citotoxicidad producida por AAPH fue el doble que la producida por SIN-1. En condiciones basales, ExA (Fig.33A) disminuyó la citotoxicidad en concentraciones altas. Ante la presencia de los agentes estresores, todas las concentraciones de ExA revirtieron significativamente el efecto de estos, siendo más marcada la reversión cuando el SIN-1 se encontraba presente. Por su parte, la concentración más baja de NDGA (Fig.33B) aumentó la citotoxicidad en condiciones basales y solo logró revertir el efecto del SIN-1 y de la combinación de SIN-1 y AAPH.

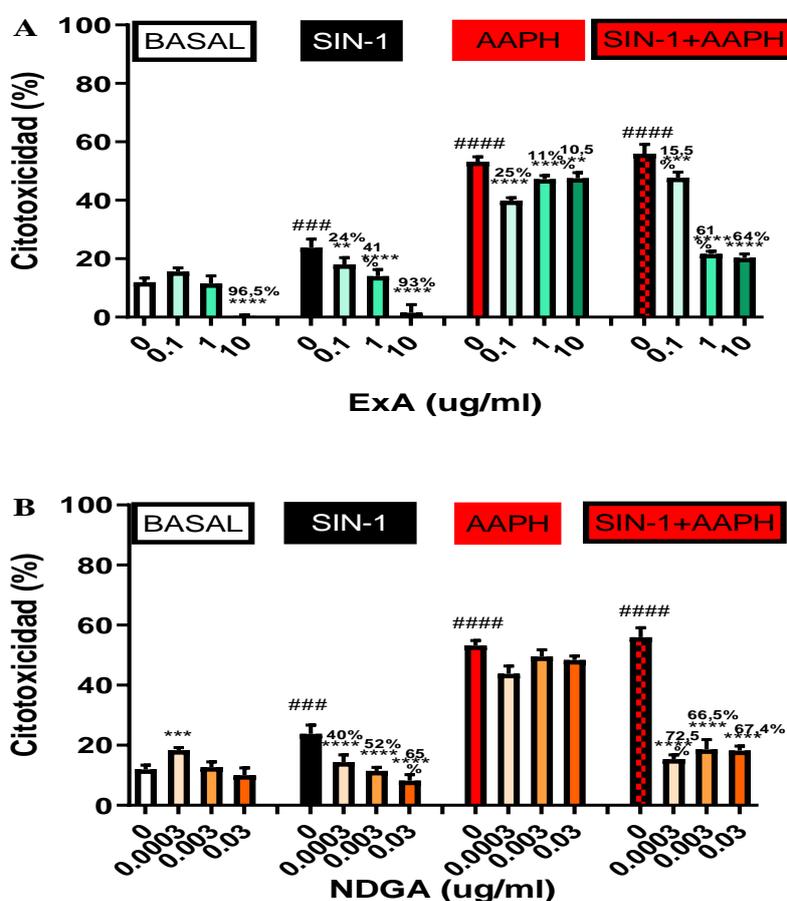


Figura 33. Efecto de ExA (A) y NDGA (B) sobre la citotoxicidad producida por SIN-1 y AAPH .

SIN-1: 20uM, AAPH:12.5uM. Las células fueron incubadas 24 hs. Los resultados representan la Media ± ESM de tres o más experimentos, realizados por triplicado. **p<0.01, ***p<0,001, ****p<0.0001; diferencias significativas respecto a cada concentración de glucosa (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett. ###p<0.001, ####p<0,0001; diferencias significativas respecto al basal (0) según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

ExA logró revertir la citotoxicidad inducida por SIN-1 y AAPH. El NDGA estaría involucrado en la reversión del efecto provocado por estrés nitrosativo

4.4. Estudio de la actividad antioxidante de ExA y NDGA en glándulas submandibulares de rata.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en los que se demostró que ExA y NDGA presentaron acción antioxidante en modelos in vitro y de cultivo celular, se planteó si serían capaces de modular la actividad antioxidante de un sistema biológico en presencia de estrés oxidativo inducido por la administración de STZ en ratas. Se eligió hacer el estudio sobre glándulas submandibulares de ratas, por la importancia que presentan las mismas, a través de su actividad antioxidante, en el control de la salud bucal. A modo de control se evaluó en primera instancia el efecto de ExA y NDGA sobre parámetros oxidativos y no oxidativos de glándulas submandibulares de ratas hembra controles, incubadas en presencia de estos. Además, este ensayo permitió la elección de las concentraciones de ExA y NDGA para su evaluación ante el insulto oxidativo.

4.4.1. Efectos del ExA y NDGA sobre parámetros oxidativos en glándulas de ratas normales.

4.4.1.1. Efecto sobre especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

En primer lugar, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de ExA y NDGA sobre las especies reactivas del oxígeno (H_2O_2 , O_2^{*-}) y del nitrógeno (ON), en las glándulas submandibulares de ratas hembra control.

Se puede observar en la Figura 34 que el extracto disminuyó las concentraciones de H_2O_2 en forma significativa con las concentraciones de 100, 500 y 1000 $\mu g/ml$. La concentración de 100 $\mu g/ml$ produjo la mayor disminución. En cuanto al O_2^{*-} , el extracto produjo aumento con la concentración de 100 $\mu g/ml$, mientras una disminución significativa fue observada con la concentración de 500 y 1000 $\mu g/ml$ (Figura 34 C). Con respecto al ON, ninguna concentración de extracto modificó los niveles en forma significativa (Figura 34 E).

En cuanto al NDGA, el mismo fue estudiado en las concentraciones presentes en las concentraciones ensayadas del extracto. El NDGA disminuyó los niveles de H_2O_2 y O_2^{*-} con la concentración 1,5 $\mu g/ml$, mientras que con la concentración de 3,41 $\mu g/ml$ disminuyó los niveles de H_2O_2 y aumentó los niveles de O_2^{*-} (Figura 34 B y D). Los niveles de ON fueron disminuidos significativamente por concentraciones bajas de NDGA (0,084 y 0,17 $\mu g/ml$) (Figura 34 F). La disminución del H_2O_2 por 1,5 $\mu g/ml$ de NDGA fue mayor que la ejercida por 500 $\mu g/ml$ del extracto (37.9% y 23.3% respectivamente, $*p < 0,05$) (Figura 34 A y B).

RESULTADOS

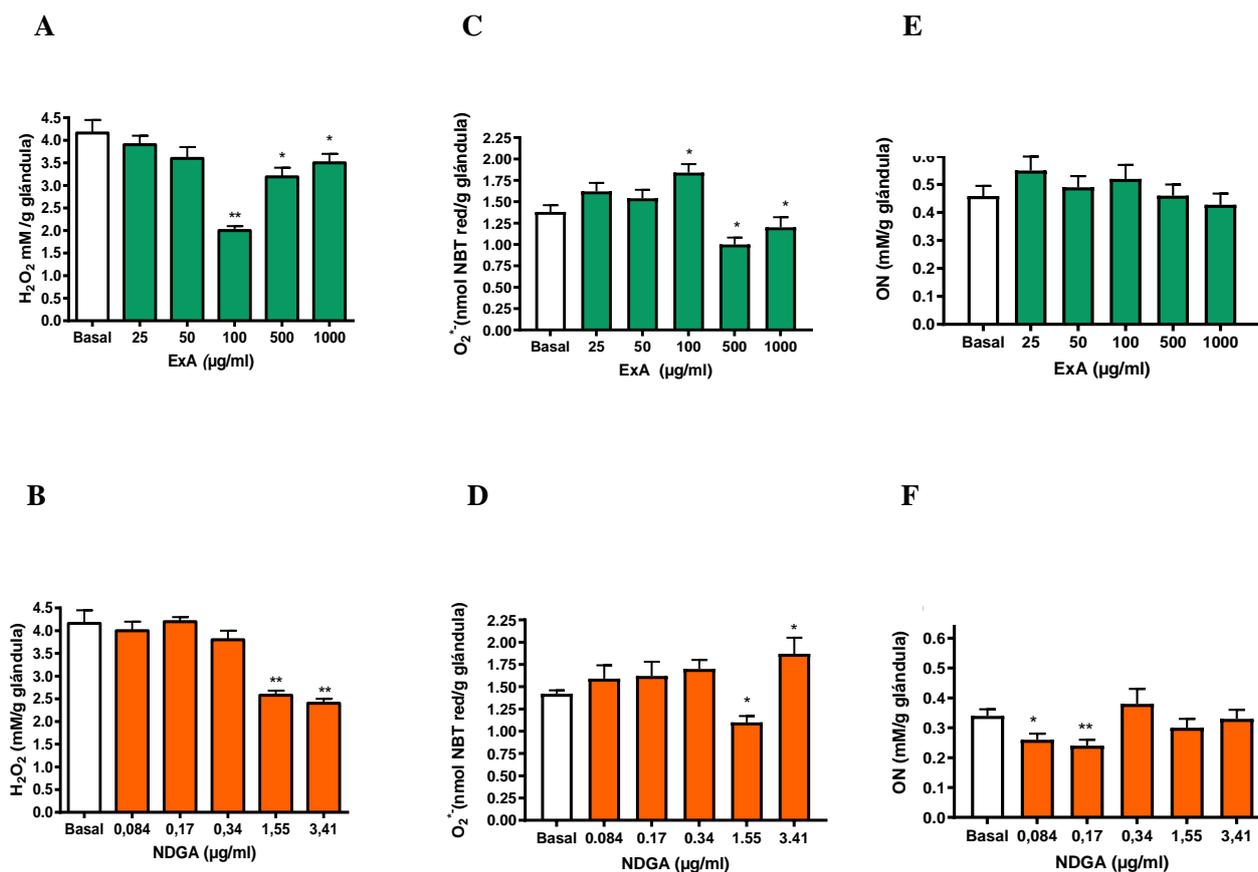


Figura 34. Efecto de ExA y NDGA sobre las especies reactivas del oxígeno (H₂O₂: A y B; O₂^{•-}: C y D; ON: E y F) en glándula submaxilar de rata normal.

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de tres o cuatro determinaciones realizadas por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al valor basal de acuerdo a ANOVA + prueba de Dunnett.

ExA fue capaz de disminuir los niveles de H₂O₂ y O₂^{•-} en relación con la presencia de NDGA.

4.4.1.2. Efecto sobre la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas.

Luego se estudió el efecto de ExA y del NDGA sobre la oxidación de lípidos y proteínas. Se puede observar en la Figura 35 A y C que las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de ExA disminuyeron la oxidación basal de lípidos y de proteínas. El NDGA también disminuyó la oxidación basal tanto de lípidos como de proteínas en casi todas las concentraciones probadas (Figura 35 B y D). Sin embargo, el efecto sobre la oxidación de proteínas fue menor que el ejercido por ExA (NDGA 1.55 $\mu\text{g/ml}$ = 10.1%; ExA 500 $\mu\text{g/ml}$ = 52.2%; $p < 0,05$).

RESULTADOS

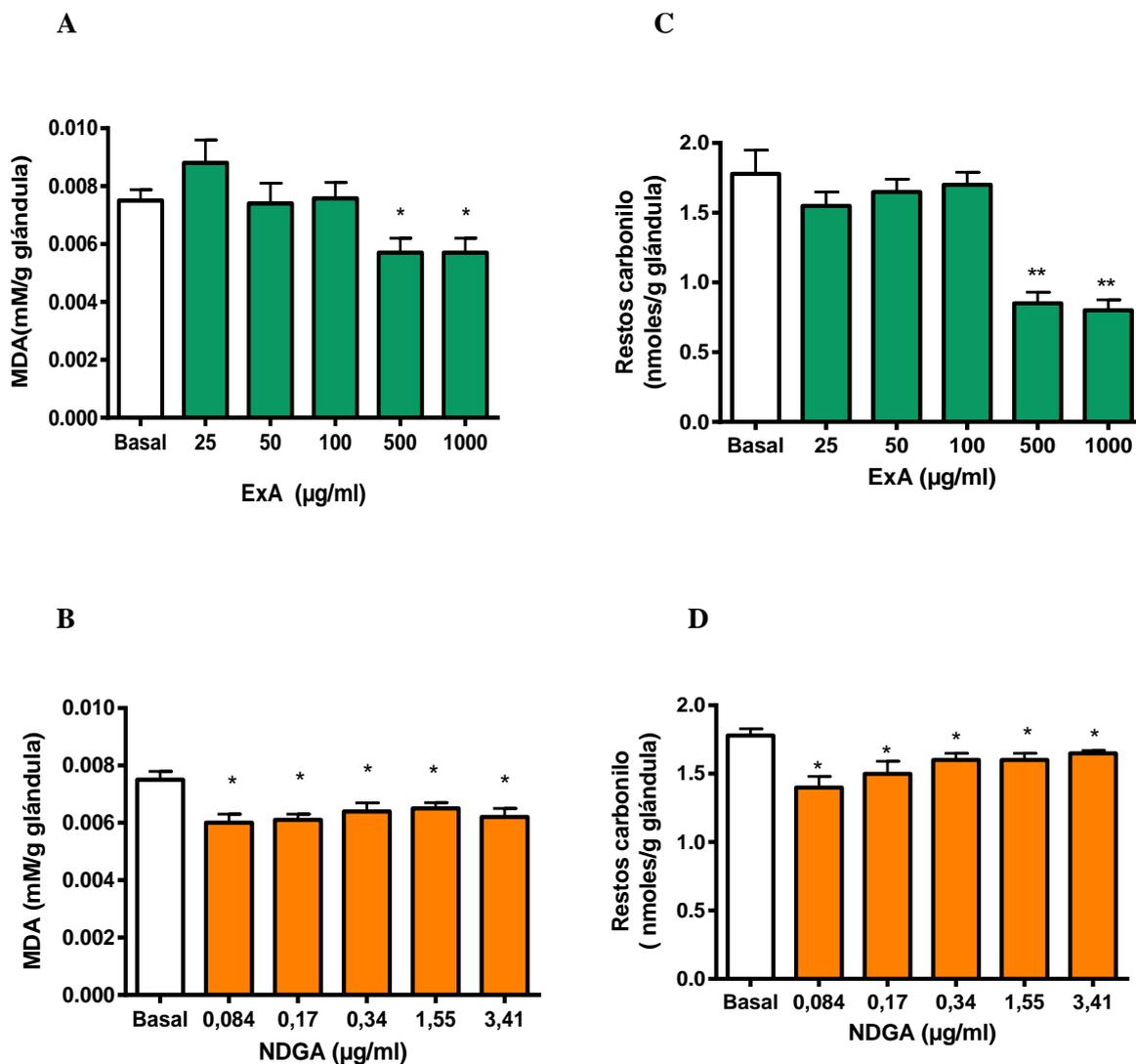


Figura 35. Efecto del extracto y NDGA sobre la oxidación de lípidos (A y B) y proteínas en glándulas submandibulares de ratas normales (C y D).

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de tres o cuatro determinaciones realizadas por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al valor basal de acuerdo a ANOVA + prueba de Dunnett.

ExA disminuyó la oxidación de proteínas y la formación de MDA en relación a la presencia de NDGA y otros compuestos presentes.

4.4.2. Efecto de ExA y NDGA sobre parámetros antioxidantes en glándulas de ratas normales

4.4.2.1. Sobre sistemas enzimáticos glandulares

Seguidamente se estudió el efecto de ExA y del NDGA sobre los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes Px, CAT y SOD en las glándulas normales. Se puede observar en la Figura 36 A que el extracto aumentó significativamente la actividad Px en la concentración de 500 y 1000 µg/ml, mientras que las mismas concentraciones disminuyeron la actividad CAT y SOD (Figura 37 C y E). La disminución de la actividad CAT se vio también con la concentración de 100 µg/ml (Figura 37, C).

El NDGA también aumentó la actividad Px en las concentraciones de 1,55 y 3,41 µg/ml (Figura 37 B), pero el efecto fue menor que el del ExA ($p < 0.05$). Con respecto a la actividad CAT, el NDGA produjo una respuesta bifásica, la que se tradujo en una disminución de la actividad con concentraciones bajas (0,17, 0,34, 1,55 µg/ml) y aumento de la misma con la concentración de 3,41 µg/ml (Figura 37 F). Por otro lado, el NDGA disminuyó la actividad SOD en casi todas las concentraciones ensayadas (Figura 37, D).

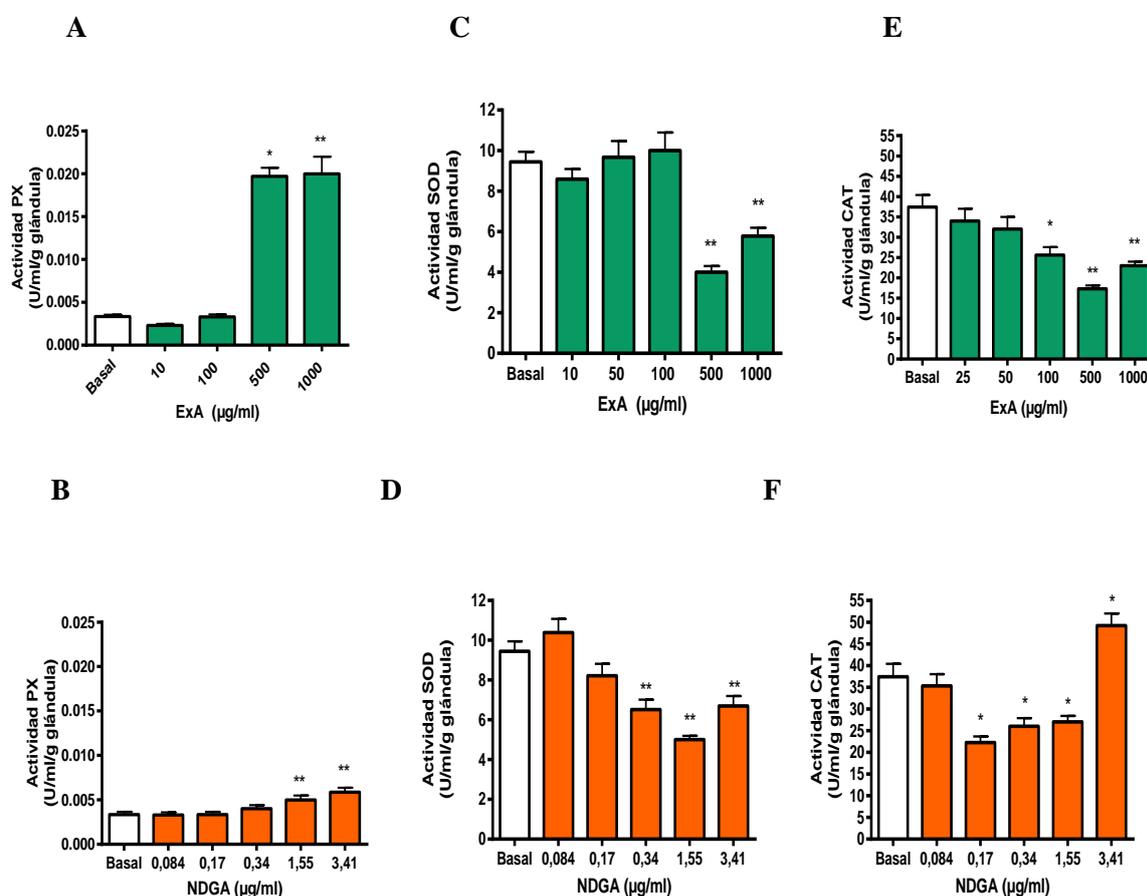


Figura 37. Efecto del extracto y NDGA sobre las enzimas antioxidantes (Px, SOD y CAT) en glándulas submandibulares de ratas normales.

Los resultados representan la actividad enzimática total y se expresan como la Media ± ESM de tres o cuatro determinaciones realizadas por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al valor basal de acuerdo a ANOVA + prueba de Dunnett.

ExA aumentó la actividad Px en relación al NDGA y a otros compuestos presentes; disminuyó la actividad SOD y CAT en relación con el NDGA.

4.4.2.2. Sobre sistemas no enzimáticos

El extracto aumentó solamente en forma significativa los niveles de glutatión reducido en la concentración de 25 µg/ml (Figura 38 A). Por otro lado, el NDGA, aumentó significativamente los niveles en relación directa con todas las concentraciones ensayadas (Figura 38 B).

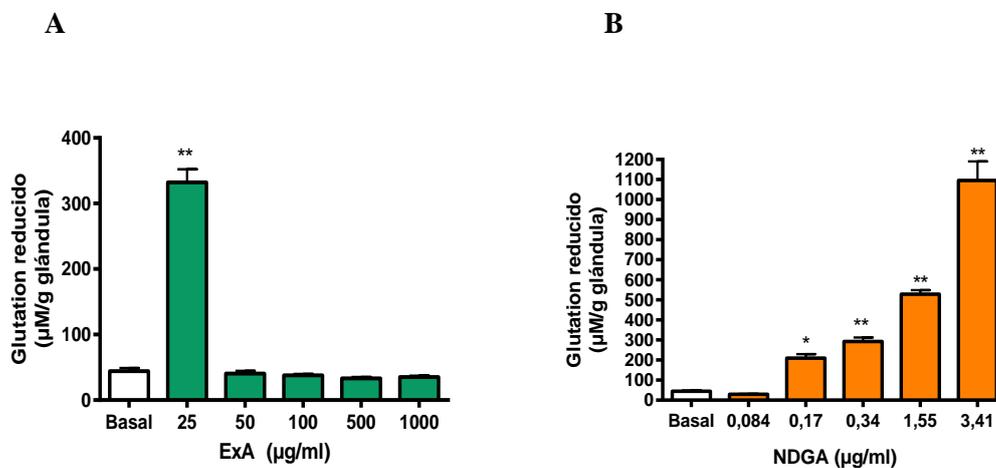


Figura 38. Efecto de ExA y NDGA sobre los niveles de glutatión reducido en glándulas submandibulares de ratas normales.

Los resultados se expresan como la Media ± ESM de tres o cuatro determinaciones realizadas por duplicado. *p< 0,05, **p<0,01 diferencias significativas respecto al valor basal de acuerdo a ANOVA + prueba de Dunnett.

ExA aumentó los niveles de GSH sin guardar relación con la presencia de NDGA.

4.4.3. Efecto de ExA y NDGA en un modelo de estrés oxidativo inducido en glándulas submandibulares por la administración de estreptozotocina.

Se demostró anteriormente que ExA y NDGA fueron capaces de modular no solo las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, sino las enzimas antioxidantes en las glándulas submandibulares de animales controles. Por lo tanto, se quiso estudiar seguidamente, si estos efectos moduladores se producían frente al estrés oxidativo inducido por STZ en el mismo tejido. Para esto se administró una dosis única de STZ por vía i.p. en ratas hembra.

Se puede observar en la Tabla 6 que la administración de STZ produjo aumento de la glucemia plasmática al mismo tiempo que disminuyó el peso corporal y las proteínas plasmáticas. Por otro lado, se determinaron parámetros bioquímicos para evaluar el estado general, principalmente el funcionamiento hepático y renal. La STZ no modificó la formula hemática, pero si aumentó en forma significativa los niveles de Glucemia, urea, creatinina, triglicéridos y TGP en forma significativa comparando con animales controles.

Analito	Ratas control	Ratas tratadas con STZ
Peso corporal (g)	229,9 ± 1	114,9 ± 1**
Globulos Rojos (mm3)	7.691.428 ± 370.649	7.836.666 ± 43.628
Globulos Blancos (mm3)	9.616,6 ± 1.632	10.200 ± 1.082
Hemoglobina (g/dl)	14,75 ± 0,89	15,30 ± 0,75
Hematocrito (%)	43,83 ± 4,16	47,00 ± 2,08
Neutrofilos segmentados (%)	16,28 ± 6,55	22,6 ± 7,68
Basofilos (%)	0	0
Eosinofilos (%)	1,71 ± 1,38	2,3 ± 0,33
Linfocitos (%)	75,57 ± 6,13	69 ± 8,5
Monocitos (%)	2,71 ± 1	6 ± 1
Glucemia (mg/ml)	109 ± 4	314 ± 10**
Proteinas plasmaticas (ug/ml)	215.850 ± 5.300	143.625 ± 4.700**
Urea (mg/dl)	49,0 ± 5,0	78 ± 6,9**
Acido Urico (mg/dl)	0,918 ± 0,58	1,05 ± 0,38
Creatinina (mg/dl)	0,38 ± 0,03	0,55 ± 0,065 **
Colesterol (XX)	72,0 ± 8,0	72,25 ± 4,49

Tabla 6. Parámetros bioquímicos en ratas hembra normales y tratadas con estreptozotocina.

Valores expresados como media ± DS de una muestra de 5 animales controles y 5 animales tratados con estreptozotocina. *p< 0,05; **p<0.01 diferencias significativas respecto a la prueba T de Student entre valores controles y valores de ratas tratadas con estreptozotocina.

RESULTADOS

Para corroborar la inducción de estrés oxidativo sistémico se determinaron los niveles de ON y la peroxidación en plasma. El tratamiento con STZ aumento significativamente los niveles de ON y la peroxidación en plasma (Figura 39 A y B).

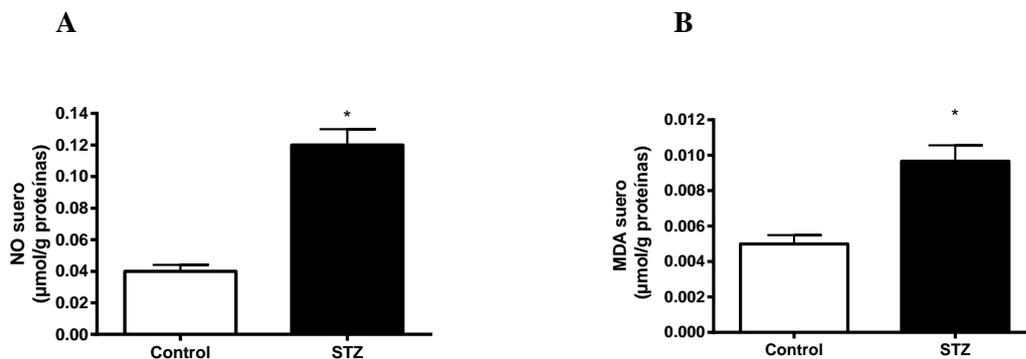


Figura 39. Niveles de ON y MDA en suero de animales controles y animales tratados con STZ. Los resultados están expresados como la Media \pm DS de 5 animales controles y 5 animales tratados. * $p < 0,05$ diferencias significativas respecto al control, de acuerdo a la prueba T de Student.

La administración de STZ aumentó significativamente los valores de glucemia, uremia, creatinemia, triglicéridos y TGP, mientras que disminuyó el peso corporal y las proteínas plasmáticas de los animales tratados y produjo estrés oxidativo.

Luego de demostrar un estado de oxidación sistémico con la administración de STZ, las glándulas submandibulares fueron disecadas de los animales y evaluadas para ver si sufrían también estrés oxidativo. Las concentraciones de ExA y NDGA fueron seleccionadas de ensayos anteriores, realizados sobre glándulas de animales normales, teniendo en cuenta su capacidad de ejercer actividad antioxidante. Se seleccionó de esta manera la concentración de 500 µg/ml de ExA y la de NDGA presente en la misma es decir de 1,55 µg/ml. La concentración de ExA fue elegida por ser la más baja en presentar la mayor actividad moduladora no solo de las especies reactivas sino de las enzimas antioxidantes.

4.4.3.1. Efecto de ExA y NDGA sobre el peso y contenido de proteínas.

Se puede observar en la Figura 40 (A y B) que la STZ disminuyó el peso glandular y el nivel de proteínas. Sin embargo, ni ExA ni el NDGA pudieron revertir el descenso del peso glandular y del contenido de proteínas inducido por la administración de estreptozotocina.

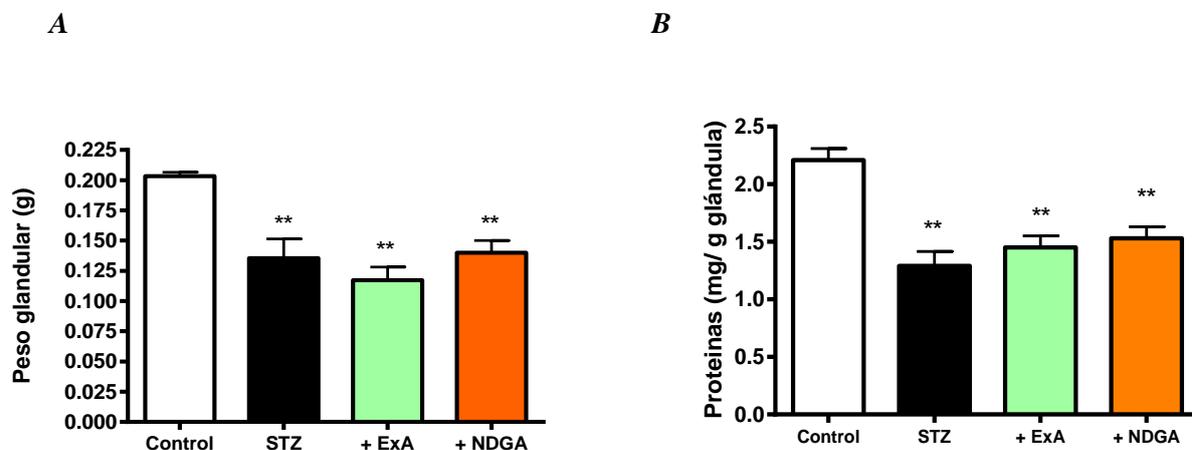


Figura 40. Respuesta de ExA y del NDGA sobre el efecto de STZ en el peso glandular (A) y en el contenido proteico (B).

Los resultados están expresados como la Media \pm DS de 4 determinaciones realizadas por duplicado. STZ: tratadas con estreptozotocina; +ExA: STZ+ExA 500 μ g/ml; +NDGA: STZ+NDGA 1,5 μ g/ml. Los resultados se expresaron por g de glándula.

4.4.3.2. Efecto de ExA y NDGA sobre las especies reactivas del oxígeno

Como se describió anteriormente el extracto en la concentración de 500 μ g/ml y el NDGA 1,55 μ g/ml disminuyeron los niveles de H_2O_2 con respecto al basal de animales normales. Por otro lado, la STZ aumentó significativamente los niveles de H_2O_2 , efecto que fue revertido tanto por el extracto como por el NDGA (Figura 41 A). Además, el extracto y el NDGA disminuyeron los niveles de anión superóxido con respecto al control, la STZ también disminuyó el nivel de anión superóxido, pero ante esta situación el extracto y el NDGA fueron capaces de revertir, en forma leve pero significativa, el fenómeno (Figura 41 B). Con respecto al ON, ni el extracto ni el NDGA modificaron los niveles basales de animales controles; sin embargo, la STZ aumentó significativamente dichos niveles y frente a esta situación tanto el extracto como el NDGA fueron capaces de revertir el efecto (Figura 41 C). Sin embargo, la reversión producida por el extracto (52.2%) fue mayor que la del NDGA (25.3%)($p < 0.05$).

RESULTADOS

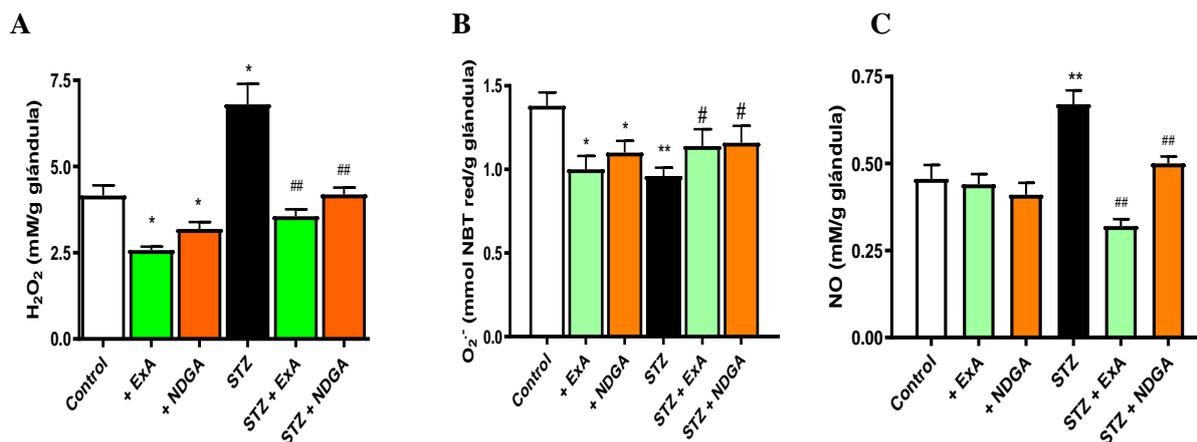


Figura 41. Efecto de ExA y del NDGA sobre las especies reactivas del oxígeno en las glándulas submandibulares de animales tratados con STZ.

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de cuatro o más determinaciones realizadas por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al control (animales no tratados) y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ diferencias significativas respecto a STZ, de acuerdo a ANOVA + test de Dunnett.

ExA disminuyó los niveles de H₂O₂ en condiciones basales y revirtió por completo el aumento provocado por STZ. El NDGA sería uno de los compuestos involucrados en esta acción.

ExA disminuyó los niveles basales de O₂⁻ y logró revertir el efecto provocado por STZ. El NDGA sería responsable de esta acción.

ExA revirtió el aumento de ON provocado por STZ y NDGA sería responsable de esta acción junto a otros compuestos.

4.4.3.3. Efecto de ExA y NDGA sobre la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas.

Seguidamente se evaluó el efecto sobre la oxidación de lípidos y de proteínas. El extracto disminuyó significativamente la oxidación basal de lípidos, así como también lo hizo el NDGA. La STZ aumentó la lipoperoxidación, efecto revertido tanto por el extracto como por el NDGA, sin embargo, el efecto demostrado por el extracto fue significativamente mayor que el ejercido por el NDGA ($p < 0.05$) (Figura 42 A). Con respecto a la oxidación de proteínas, el extracto disminuyó la oxidación basal, al igual que el NDGA. Por otro lado, la STZ aumentó significativamente la oxidación de proteínas, y frente a esta situación tanto el extracto como el NDGA revirtieron la situación. Sin embargo, la reversión producida por el extracto (84.0%) fue total en comparación con la producida por el NDGA (25.9%) que fue parcial ($p < 0.05$) (Figura 42 B).

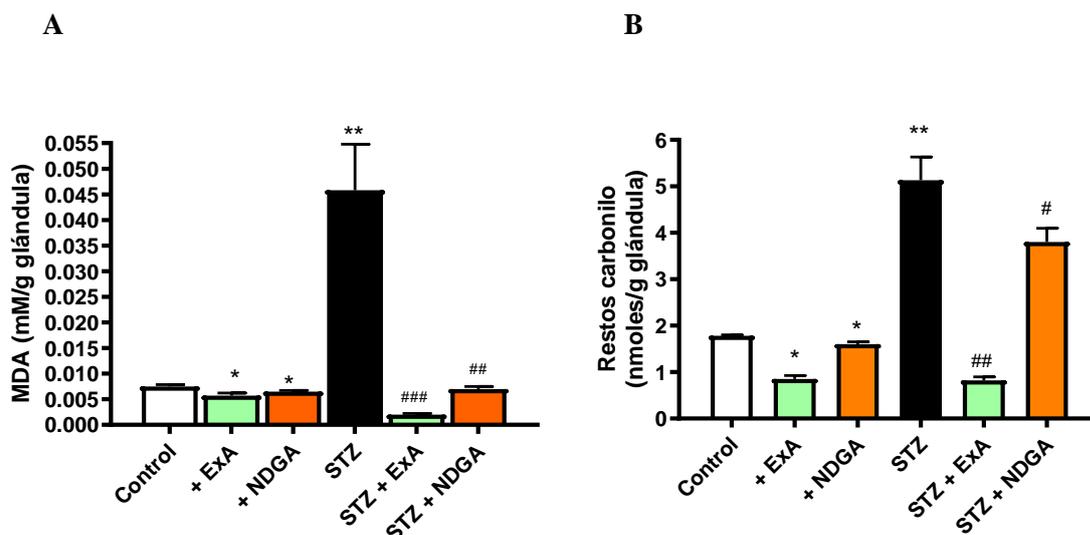


Figura 42. Efecto del extracto y del NDGA sobre la oxidación de lípidos (A) y proteínas (B) en glándulas submandibulares de animales tratados con STZ.

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de cuatro o más determinaciones realizadas por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al control (animales no tratados) y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ diferencias significativas respecto a STZ, de acuerdo a ANOVA + test de Dunnett.

ExA revirtió el efecto de STZ sobre la oxidación de lípidos y proteínas, otros compuestos además del NDGA estarían involucrados

4.4.3.4. Estudios histológicos

Con el objetivo de evaluar si la STZ era capaz de producir alteración en los tejidos, se realizó un estudio histológico de los mismos. **La STZ no produjo alteraciones histológicas ni en ausencia ni en presencia del extracto o del NDGA** (Figura 43 A, B, C, D).

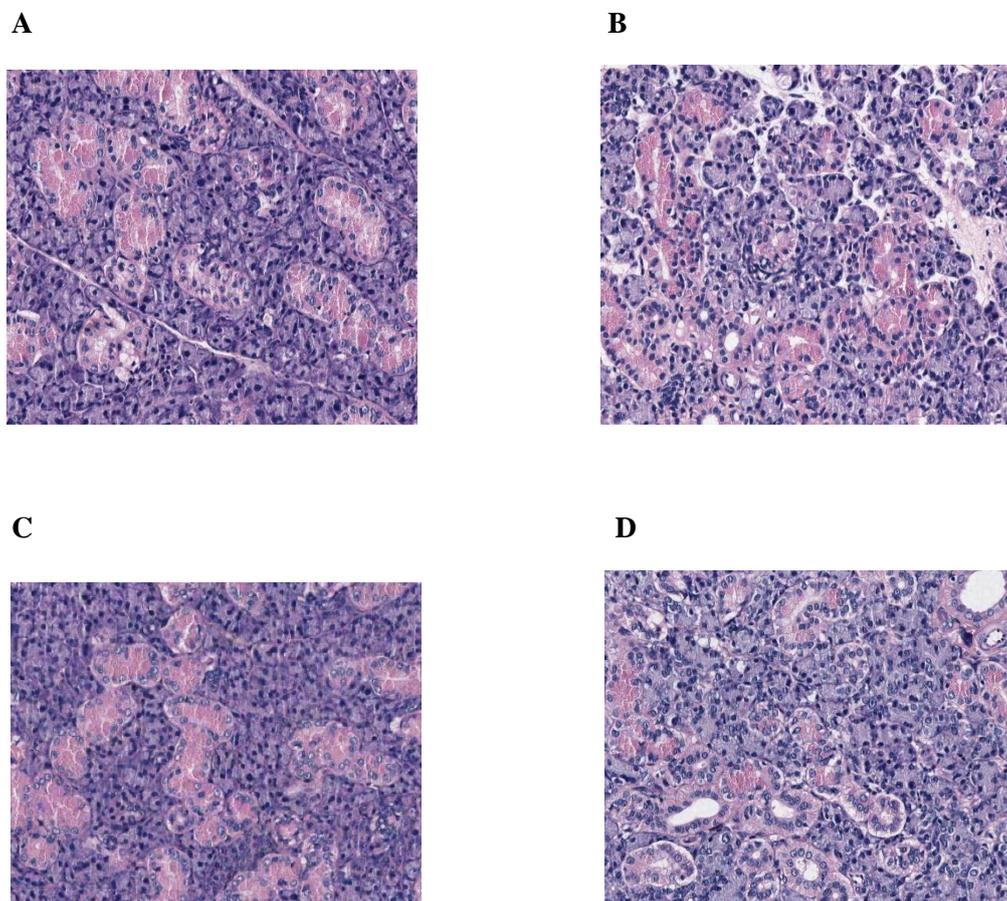


Figura 43. Estudio histológico de glándulas submandibulares de ratas controles (A), ratas tratadas con estreptozotocina (B), con STZ + ExA (C) y con STZ + NDGA (D).

Las glándulas fueron cortadas, fijadas y teñidas con eosina-hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio óptico con un aumento de 20x.

4.4.3.5. Efecto de ExA y NDGA sobre los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

En cuanto a las enzimas antioxidantes, ExA y NDGA aumentaron significativamente la actividad Px basal. La STZ disminuyó la actividad Px y tanto el extracto como el NDGA revirtieron este efecto (Figura 44 A). Sin embargo, la reversión producida por el extracto fue significativamente superior a la producida por el NDGA ($p < 0.05$). Con respecto a la actividad SOD, en condiciones basales el extracto y el NDGA disminuyeron la actividad. La STZ aumentó significativamente dicha actividad, pero ExA y NDGA revirtieron este efecto (Figura 44 B). Cabe destacar que la reversión producida por el extracto fue superior a la del NDGA ($p < 0.05$). Con respecto a la actividad CAT, ExA y NDGA dis-

RESULTADOS

minuyeron dicha actividad basal. La STZ disminuyó la actividad basal, lo cual fue revertido tanto por ExA como por NDGA (Figura 44 C). Cabe destacarse que la reversión ejercida por el extracto fue superior a la del NDGA ($p < 0.05$).

Con respecto al glutatión reducido, el NDGA fue capaz de aumentar los niveles basales y la STZ también, pero ni el extracto ni el NDGA modificaron este aumento (Figura 45).

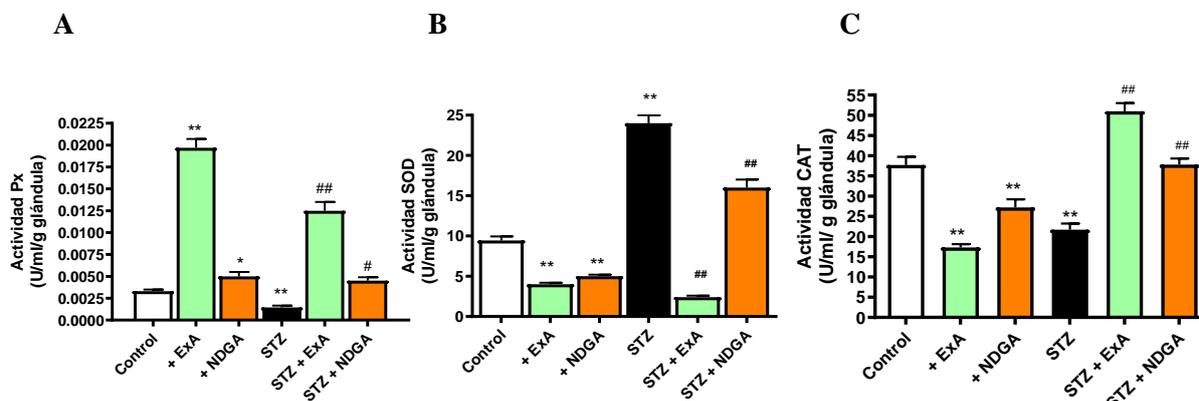


Figura 44. Efecto de ExA y NDGA sobre la actividad de enzimas antioxidantes en glándulas submandibulares de animales tratados con STZ.

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de cuatro o más determinaciones realizadas por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al control (animales no tratados) y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ diferencias significativas respecto a STZ, de acuerdo a ANOVA + prueba de Dunnett.

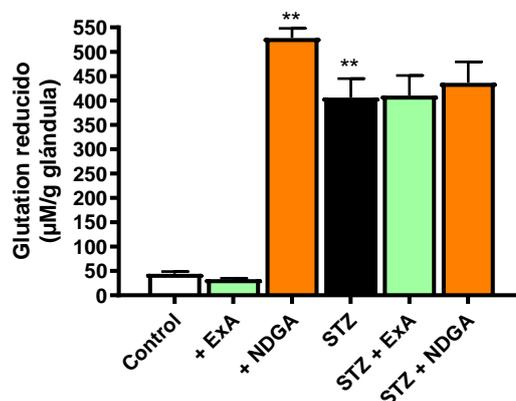


Figura 45. Efecto de ExA y NDGA sobre los niveles de glutatión reducido en glándulas submandibulares de animales tratados con STZ.

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de cuatro o más determinaciones realizadas por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto al control (animales no tratados) y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ diferencias significativas respecto a STZ, de acuerdo a ANOVA + test de Dunnett.

ExA revirtió el efecto de STZ sobre la Px, CAT y SOD, el NDGA podría ser uno de los compuestos involucrados además de otros compuestos

4.4.3.6. Efecto de ExA y NDGA sobre la expresión de Px e iNOS

Para determinar el mecanismo de acción de ExA y NDGA sobre las enzimas y analizar si un aumento o disminución de la actividad enzimática se debía a una modificación de la expresión de las mismas o a una modificación en la actividad propiamente dicha, se determinó en primer lugar el efecto sobre la expresión enzimática. Se estudio fundamentalmente la expresión de Px, por ser la enzima más importante de la cavidad bucal en relación con la eliminación de ERO's y ERN's y sobre la iNOS, involucrada en la eliminación de ERN's.

La STZ disminuyó la expresión de Px, como puedo observarse en la intensidad relativa de las bandas de proteína inmunorreactiva, mientras que el tratamiento con ExA y NDGA fue capaz de revertir el efecto, aumentando la expresión de la misma (Figura 46 y Tabla adjunta).

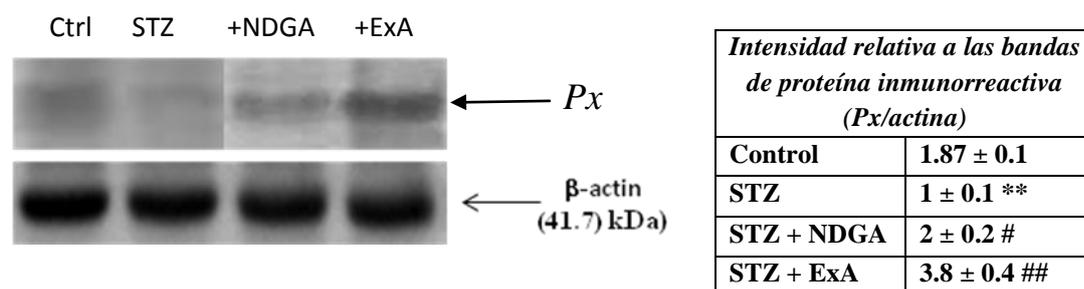


Figura 46. Estudio de la expresión de Px en glándulas submandibulares de ratas controles y ratas tratadas con estreptozotocina en ausencia y presencia de ExA y NDGA.

Ctrl: control; STZ: tratadas con estreptozotocina; +ExA: STZ+ExA 500 µg/ml; +NDGA: STZ+NDGA 1,5 µg/ml. **p< 0,05 respecto al control de acuerdo a la prueba T de Student; #p<0,05 respecto a tratadas con estreptozotocina; ##p<0,01 respecto a tratadas con estreptozotocina, según ANOVA + prueba de Dunnett

Con respecto a iNOS, la STZ aumentó significativamente la expresión de la enzima, mientras que el extracto y el NDGA revirtieron este efecto, disminuyendo la expresión, el efecto del NDGA fue mayor que el ejercido por el extracto (Figura 47 y Tabla adjunta).

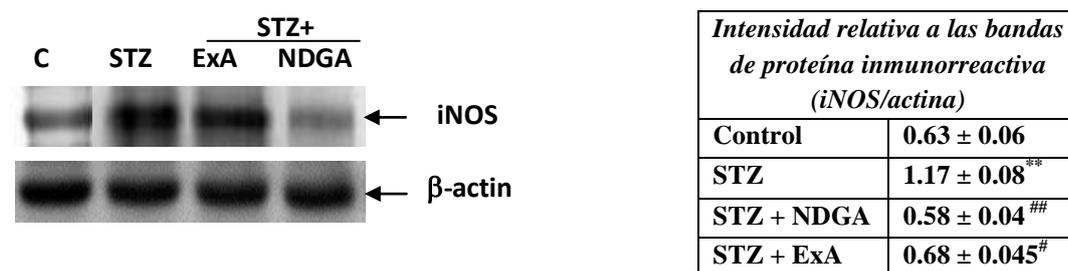


Figura 47. Efecto de ExA y NDGA sobre la expresión de iNOS por Westernblot.

C: control; STZ: tratadas con estreptozotocina; ExA: ExA 500 µg/ml; NDGA: NDGA 1,5 µg/ml. **p< 0,05 respecto al control de acuerdo a la prueba T de Student; #p<0,05 respecto a tratadas con estreptozotocina; ##p<0,01 respecto a tratadas con estreptozotocina, según ANOVA+prueba de Dunnett.

El tratamiento con STZ disminuyo la expresión de Px mientras que aumento la expresión de iNOS. ExA logro revertir el efecto de STZ y el NDGA podría estar involucrado en esta acción.

4.5. Efectos de ExA en un modelo de estrés oxidativo inducido por estreptozotocina “in vivo”

Teniendo en cuenta la actividad antioxidante de ExA y NDGA sobre modelos biológicos y no biológicos “in vitro” y que la administración de estreptozotocina (STZ) es capaz de inducir estrés oxidativo, se decidió evaluar la actividad antioxidante en un modelo “in vivo” de diabetes inducida por la administración de STZ en ratones Balb/c. La dosis de ExA administrada fue de 1g/Kg/día.

4.5.1. Estudio de la toxicidad sub-crónica de ExA y NDGA

Antes de comenzar los estudios con STZ in vivo, se estudió la toxicidad sub-crónica oral de ExA y NDGA. Para ello, se utilizaron dosis de ExA y NDGA seleccionadas de los estudios “in vivo” realizados previamente por este grupo de trabajo. Los animales tratados no mostraron ningún signo de mortalidad durante el estudio de 28 días con dosis repetidas diariamente. No se observó ninguna anomalía oftalmológica, en el sistema nervioso central autónomo, en la actividad somatomotora o en los patrones de comportamiento, que fuera significativa tanto con ExA o con NDGA (tabla 7).

No se registraron cambios significativos en el peso corporal entre el control normal y los grupos de tratamiento tanto de animales machos o hembras con ambos tratamientos. Los parámetros hematológicos y bioquímicos no parecían verse afectados por ExA en ninguna dosis analizada o por NDGA, ya que no se notaron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles. El único parámetro afectado con los tratamientos fue el número de eosinófilos que disminuyó con ExA y NDGA en todas las dosis (la Tabla 8 presenta los resultados obtenidos con la dosis máxima analizada). Además, no se observaron cambios histológicos en los órganos analizados proveniente de los animales tratados con ExA en diferentes dosis o NDGA (Peralta y col, 2015).

Signo clínico	Tiempo (hs)					
	0.5	1	2	6	24	48
Estimulación del Sistema Nervioso Central						
Hiperactividad	-	-	-	-	-	-
Piloereccion	-	-	-	-	-	-
Espasmo	-	-	-	-	-	-
Rigidez	-	-	-	-	-	-
Irritabilidad	-	-	-	-	-	-
Convulsiones	-	-	-	-	-	-
CTCG	-	-	-	-	-	-
Ptosis	-	-	-	-	-	-
Depresión del Sistema Nervioso Central						
Sedacion	-	-	-	-	-	-
Perdida de tono muscular	-	-	-	-	-	-
Catatonía	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Observación preliminar del efecto de ExA hasta 48hs después de su administración

- Sin efectos. CTCG: crisis tónico clónicas generalizadas

RESULTADOS

PARAMETRO	Control H	Control M	NDGA H	NDGA M	ExA H	ExA M
Glóbulos Rojos	7,2 ± 0,6	8,2 ± 0,9	7,3 ± 0,5	8,3 ± 0,5	7,0 ± 0,6	8,0 ± 0,6
Glóbulos Blancos	5,8 ± 0,3	6,0 ± 0,6	4,8 ± 0,5	6,8 ± 0,5	4,9 ± 0,4	6,9 ± 0,4
Hemoglobina	12,2 ± 1,0	13,2 ± 1,0	11,9 ± 0,9	14,9 ± 0,9	12,3 ± 1,0	14,3 ± 1,0
Hematocrito	36,0 ± 3,0	38,0 ± 3,0	33,0 ± 3,0	34,0 ± 3,0	34,0 ± 2,0	38,0 ± 2,0
VCM	49,0 ± 5,0	51,0 ± 5,0	48,0 ± 4,0	50,0 ± 6,0	49,7 ± 5,0	55,7 ± 5,0
HCM	16,8 ± 1,0	18,8 ± 1,0	17,5 ± 2,0	19,5 ± 2,0	18,1 ± 1,0	19,1 ± 1,0
CHCM	34,3 ± 3,0	36,3 ± 3,0	35,5 ± 4,0	37,5 ± 5,0	36,3 ± 4,0	38,6 ± 4,0
RDW	12,8 ± 1,0	13,8 ± 1,0	13,0 ± 0,9	13,6 ± 0,9	12,7 ± 1,0	14,7 ± 1,5
Neutrófilos (%)	37,5 ± 9,0	38,5 ± 9,0	30,5 ± 5,0	36,5 ± 5,0	32,0 ± 5,0	35,0 ± 5,0
Eosinófilos (%)	5,0 ± 0,6	6,0 ± 0,6	1,8 ± 0,6**	1,9 ± 0,5**	2,0 ± 0,2**	2,8 ± 0,2**
Basófilos (%)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Linfocitos (%)	56,3 ± 8,5	58,3 ± 8,5	62,5 ± 6,0	59,5 ± 6,0	64,8 ± 7,5	62,8 ± 7,5
Monocitos (%)	9,0 ± 0,8	9,8 ± 0,8	7,5 ± 0,7	8,5 ± 0,7	6,8 ± 0,8	7,5 ± 0,8
Plaquetas/mm³	727,0 ± 60	737,0 ± 70	715,0 ± 70	730,0 ± 70	788,0 ± 70	786,0 ± 80
Colesterol total	91,0 ± 4,2	92,0 ± 5,0	92,5 ± 4,0	94,0 ± 8,0	95,5 ± 3,5	96,0 ± 9,5
Triglicéridos	146 ± 5,6	150 ± 6,6	152 ± 9,0	158 ± 10	154 ± 5,6	155 ± 10
Creatinina	0,32 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,32 ± 0,04
ALT	28,0 ± 6,0	29,0 ± 5,0	29,0 ± 6,8	30,0 ± 5,0	20,0 ± 5,0	25,0 ± 5,0

Tabla 8. Análisis de sangre de animales tratados con ExA 250 mg/kg y NDGA 1,45 mg/kg.

Los resultados se expresan como la Media ± D.S. de 5 animales por grupo. **p<0,01 respecto al control según prueba estadística de T de Student. Glóbulos Rojos [mill/mm³], Glóbulos Blancos [mil/mm³], Hemoglobina [g/dl], VCM: volumen corpuscular medio [fL], HCM: hemoglobina corpuscular media [pG], CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media [g/dl], RDW: índice de distribución de glóbulos rojos, Colesterol total [mg%], Triglicéridos [mg%], Creatinina [mg/dl], ALT: alanina aminotransferasa [IU/l].

4.5.2. Efecto sobre la glucemia y sobre el peso corporal en animales sanos.

Primeramente, se evaluó el efecto de la administración oral e intraperitoneal del extracto en animales sanos (sin tratamiento con STZ). No se observaron diferencias significativas con respecto al control (Basal) en cuanto a la glucemia y al peso corporal de los animales luego de un mes de tratamiento.

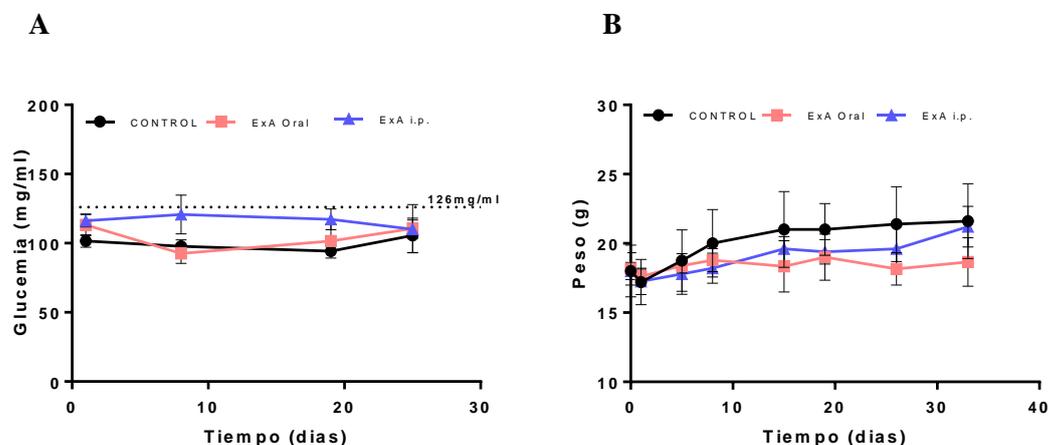


Figura 48. Efecto de la administración oral e intraperitoneal de ExA sobre la glucemia (A) y el peso corporal (B) en ratones sanos.

Los resultados representan la Media \pm DS de cada grupo. No se observan diferencias significativas respecto al Control.

ExA no modificó significativamente la glucemia ni el peso corporal de ratones sanos.

4.5.3. Efecto de ExA en animales tratados con STZ

Para este estudio se administró, por vía intraperitoneal, una dosis de 40mg/kg/día de STZ durante 5 días (día -19 a -14) a 3 grupos de 6 animales separados aleatoriamente. Paralelamente se mantuvo un grupo Control (sin STZ). Se controló periódicamente el peso y la glucemia de los animales. Cuando los niveles de glucemia de los 3 grupos tratados superó los 150 mg/ml se comenzó con la administración diaria de ExA de forma oral o intraperitoneal (i.p.) según el grupo. El día de comienzo del tratamiento se consideró día cero (Día 0). La administración de las drogas y las determinaciones analíticas se realizaron siempre en el mismo horario. Al finalizar el tratamiento, luego de 1 mes de administración de ExA, se recolectó sangre de cada animal para luego realizar las determinaciones plasmáticas.

4.5.3.1. Efectos sobre la glucemia.

Durante el tratamiento con STZ se determinó la glucemia a través del método de Accu-chek® en la sangre obtenida por punción de la vena caudal, con una frecuencia semanal. En la figura 49 se puede observar que en los grupos tratados con STZ la glucemia aumentó gradualmente hasta superar los 150 mg/ml (dos determinaciones consecutivas por encima 126mg/ml es diagnóstico de Diabetes). A partir del inicio del tratamiento por vía oral, se produjo un descenso de la glucemia del 33,1% en la primera semana de tratamiento. ExA, logro disminuir la glucemia a los niveles del Control y los mantuvo por debajo de 126mg/ml durante dos semanas y por debajo de 150mg/ml durante todo el tratamiento.

La administración de ExA por vía i.p. disminuyo la glucemia (13,0%) durante la primera semana (días 0-7), tomando como control el valor de glucemia obtenido el día 0.

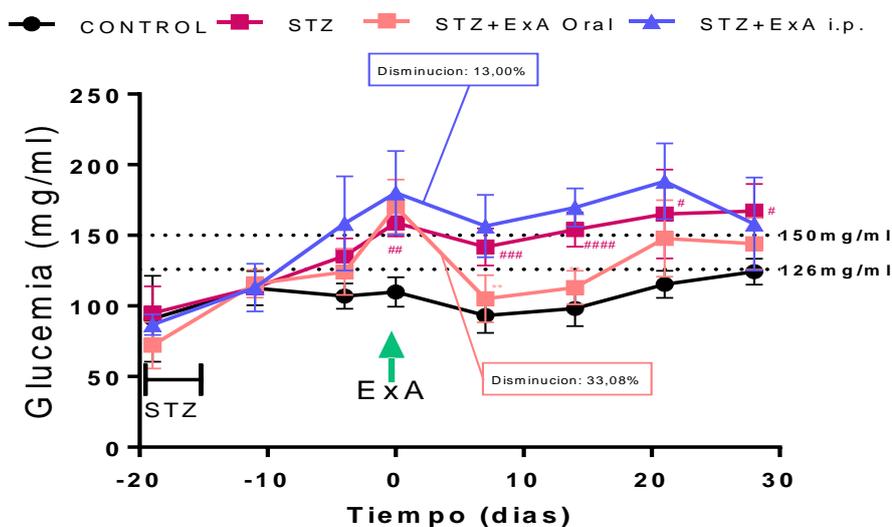


Figura 49. Efecto de la administración oral e intraperitoneal de ExA sobre la glucemia de ratones hembra con Diabetes inducida por STZ.

Los resultados representan la Media \pm DS de cada grupo (n:6). ** <0,01 diferencias significativas respecto a STZ según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0,05; ##p<0,01; ###<0,001; ####p<0,0001; diferencias significativas respecto al Control según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

La administración oral de ExA revirtió el aumento de la glucemia inducido por STZ durante las primeras dos semanas de tratamiento, manteniendo los niveles por debajo de 150 mg/ml.

4.5.3.2. Efectos sobre el peso corporal.

A continuación, se muestra (Figura 50) la variación del peso por grupo a lo largo del tratamiento. Se puede observar que el grupo Control aumentó de peso con el tiempo, mientras que el grupo STZ aumentó significativamente menos con respecto al control. Por su parte, en los grupos tratados con STZ, ExA por vía i.p., aumentó mucho menos el peso con respecto al grupo STZ control principalmente durante los primeros 21 días de tratamiento, mientras ExA por vía oral, directamente disminuyó el peso corporal.

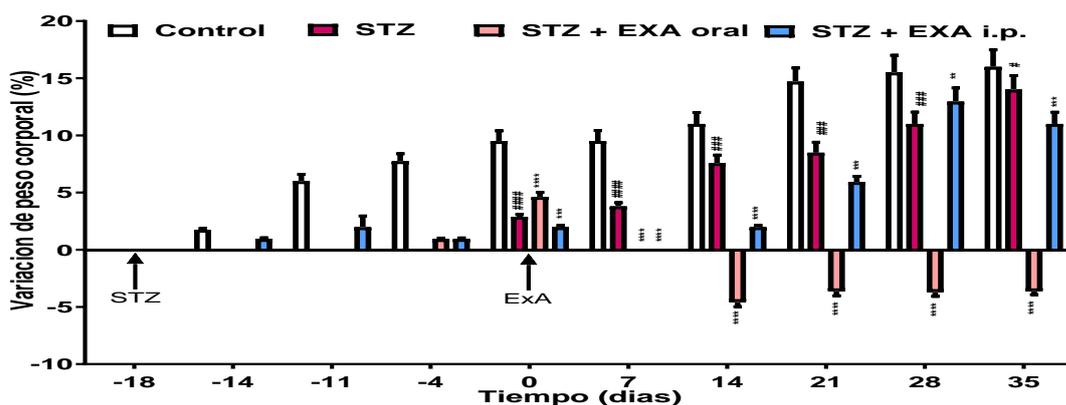


Figura 50. Efecto de la administración oral e intraperitoneal de ExA sobre el peso de ratones hembra con Diabetes inducida por STZ.

Los resultados representan la Media \pm DS de cada grupo (n:6). **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 diferencias significativas respecto a STZ según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0,05; ###p<0,001; ####p<0,0001 diferencias significativas respecto al Control según Prueba de Student.

La administración intraperitoneal de ExA dificultó la recuperación del peso de los ratones tratados con STZ mientras que la administración oral disminuyó el peso de los mismos.

4.5.3.3. Efectos sobre el metabolismo lipídico

Debido a la íntima relación que poseen las lipoproteínas con el desarrollo de la diabetes se decidió estudiar los efectos de ExA sobre los niveles de Triglicéridos y Colesterol total.

En primer lugar (Fig.51 A) se evidencia un aumento de los TG en los animales tratados con STZ con respecto al control. ExA no modificó los valores de TG controles con ningún tratamiento, pero fue capaz de revertir el aumento inducido por la STZ cuando se administró por vía i.p..

En la Figura 51 B, se observa un aumento significativo del colesterol en el grupo STZ con respecto al control. Por otro lado, la administración de ExA no modificó los valores de colesterol de los controles, pero logró disminuir en forma significativa estos valores con respecto al grupo STZ cuando fue administrada por vía oral. Si bien la administración de EXA por vía i.p. tendió a bajar estos valores, no lo hizo en forma significativa.

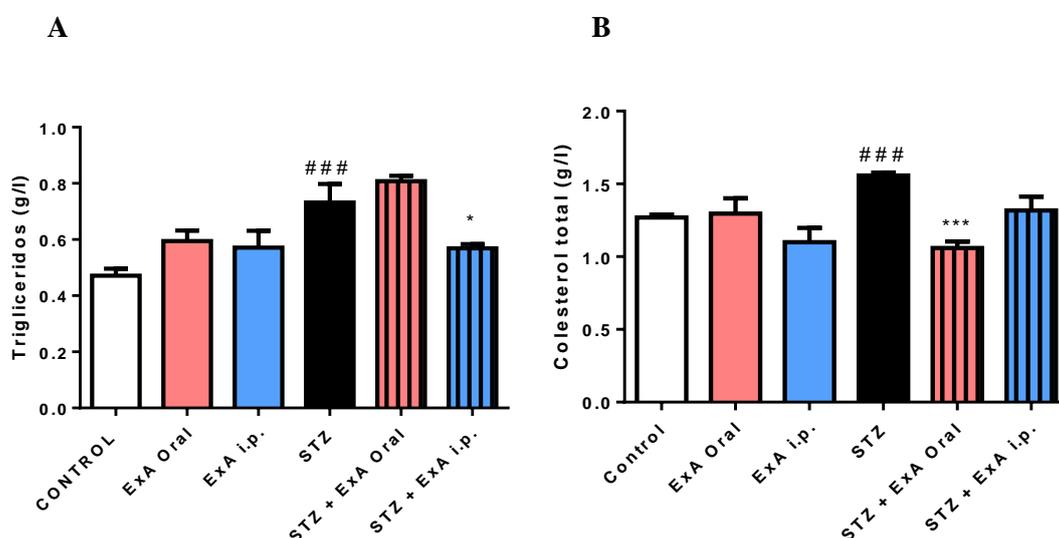


Figura 51. Efecto de la administración oral e intraperitoneal de ExA sobre los niveles de TG (A) y Col total (B) en plasma de ratones hembra con Diabetes inducida por STZ.

Los resultados representan la Media ± DS de cada grupo (n:6). *p<0,05; ***p<0.001 diferencias significativas respecto a STZ según ANOVA+ Prueba de Dunnett. ###p<0,001 diferencias significativas respecto al Control según Prueba de Student.

La administración i.p. de ExA revirtió el aumento de los TG inducido por la STZ y la administración oral revirtió el aumento del Colesterol total inducido por STZ.

4.5.3.4. Efectos sobre la peroxidación lipídica.

Con el objetivo de evaluar si el modelo de diabetes inducida por la administración de STZ producía estrés oxidativo y si el extracto era capaz de modular estos efectos, una vez terminado el tratamiento y sacrificados los animales, se procedió a determinar los efectos sobre la lipoperoxidación a través del método de los TBARS en plasma. Puede observarse que STZ aumentó los niveles de TBARS plasmáticos comparado con el control normal. En condiciones normales ExA, por vía oral disminuyó el nivel de TBARS, mientras que por vía i.p., si bien se vio una tendencia a disminuir, no lo hizo en forma significativa. En condiciones diabéticas tanto ExA por vía oral como por vía i.p. revirtieron el aumento de TBARS inducidos por la STZ (Fig. 52).

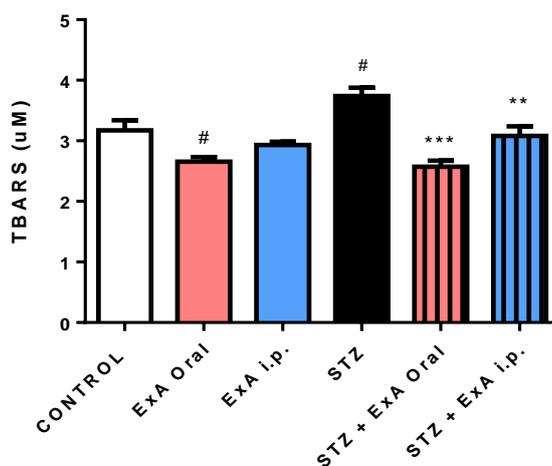


Figura 52. Efecto de la administración oral e intraperitoneal de ExA sobre la formación de TBARS en ratones hembra con Diabetes inducida por STZ.

Los resultados representan la Media \pm DS de cada grupo (n:6). **p<0,01; ***p<0.001 diferencias significativas respecto a STZ según ANOVA+ Prueba de Dunnett. #p<0,001 diferencias significativas respecto al Control según Prueba de Student.

ExA disminuyó la formación de TBARS en animales normales y revirtió, tanto por vía oral como i.p. el aumento de los mismos inducido por la administración de STZ.

4.5.3.5. Efectos sobre los niveles de GSH

Se determino seguidamente la concentración de GSH en el plasma de los animales normales y los tratados con STZ para evaluar el efecto de ExA sobre uno de los principales sistemas antioxidantes. En este caso no se observaron diferencias significativas entre el grupo control (normal) y el grupo STZ pero se evidencia que ante la administración de STZ, ExA, por vía oral, aumentó la producción de GSH significativamente, mientras que por vía i.p. descendió los niveles de GSH (Figura 53).

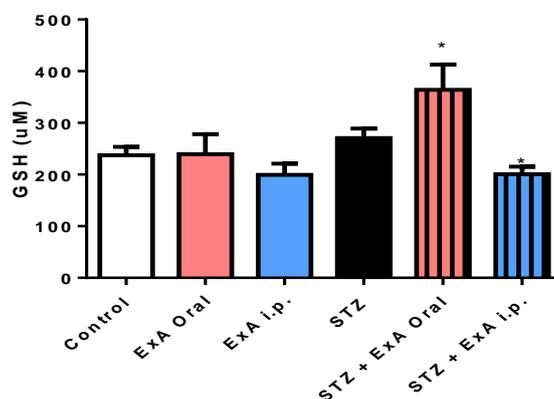


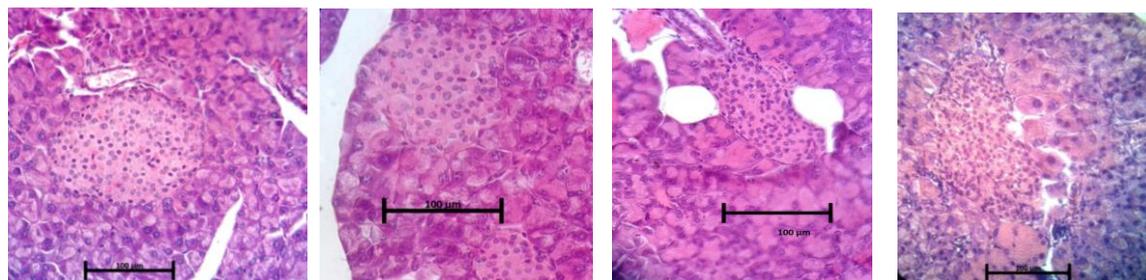
Figura 53. Efecto de la administración oral e intraperitoneal de ExA sobre los niveles de GSH en plasma de ratones hembra con Diabetes inducida por STZ.

Los resultados representan la Media \pm DS de cada grupo (n:6). * $p < 0,05$ diferencias significativas respecto a STZ según ANOVA+ Prueba de Dunnett.

ExA, por vía oral, aumentó la producción de GSH, mientras que por vía i.p. descendió los niveles de GSH.

4.5.3.6. Estudios Histológicos

El análisis histopatológico no mostro diferencias en los hígados y riñones de los animales control y los tratados con STZ, STZ + ExA Oral y STZ + ExA i.p.. Por otro lado, se pudo evidenciar el daño severo provocado por la STZ en el páncreas de los animales. Se puede apreciar la deformación de los islotes pancreáticos. En comparación con el Control, los páncreas provenientes de animales tratados con STZ presentan mayor cantidad de células más pequeñas. En ninguno de los casos, ExA pudo revertir el efecto de STZ (Figura 54).



CONTROL	STZ	STZ + ExA Oral	STZ + ExA i.p.
Area: 18.428 μm^2	Area: 4.045 μm^2	Area: 14.111 μm^2	Area: 20.124 μm^2
Células: 176	Células: 52	Células: 190	Células: 315
Ratio cel/área: 0,009	Ratio cel/área: 0.013*	Ratio cel/área: 0,013	Ratio cel/área: 0,016
Tamaño: 101 $\mu\text{m}^2/\text{cel}$	Tamaño: 74 $\mu\text{m}^2/\text{cel}^*$	Tamaño: 68 $\mu\text{m}^2/\text{cel}$	Tamaño: 63 $\mu\text{m}^2/\text{cel}$

Figura 54. Análisis histopatológico de páncreas de ratones con Diabetes inducida por STZ.

Se muestra una foto representativa de cada grupo (n:6). Los valores expresados representan la Media de cada grupo. * $p < 0,05$ diferencias significativas respecto a CONTROL según ANOVA+ Prueba de Dunnett. No se observan diferencias significativas entre el grupo STZ y los tratados con STZ + ExA.

La administración de STZ produjo una disminución en el tamaño de las células de los islotes pancreáticos.

4.6. Estudios Farmacocinéticos

4.6.1. Desarrollo de método cromatográfico para la determinación de NDGA en plasma de rata.

4.6.1.1. Validación del método de “clean up”

A partir de los cromatogramas (se muestra como ejemplo, el cromatograma correspondiente a la concentración 25 µg/ml. Figura 55) se realizó una curva de calibración (Fig. 56) con el objetivo de validar el método de clean up y poder interpolar las muestras obtenidas de ratas tratadas con ExA por vía oral.

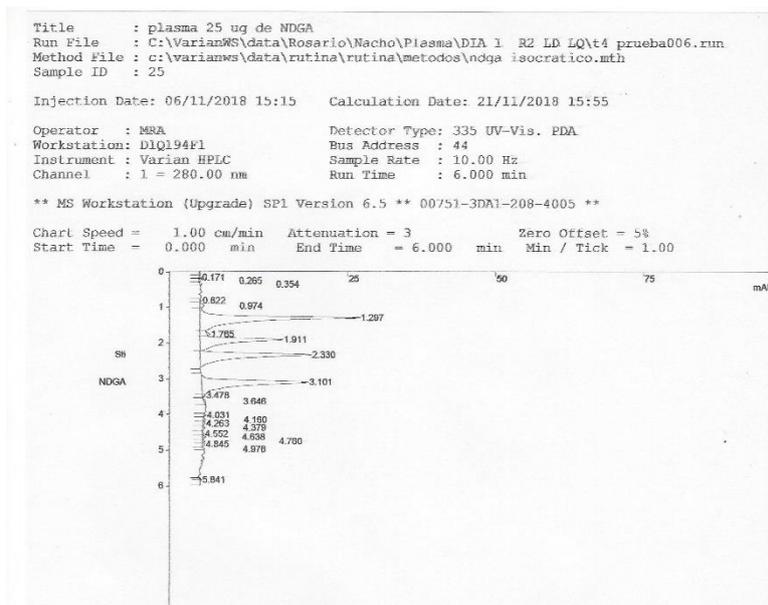


Figura 55. Cromatograma de plasma de rata suplementado con NDGA (25µg/ml)
 Tiempo de retención: NDGA (3,1min) ; Estándar Interno (2,3min)

NDGA (µg/ml)	Relación NDGA/Std interno
0,25	0,007
0,5	0,007
1,0	0,028
2,5	0,121
5,0	0,213
10,0	0,377
25,0	1,778
50,0	4,339

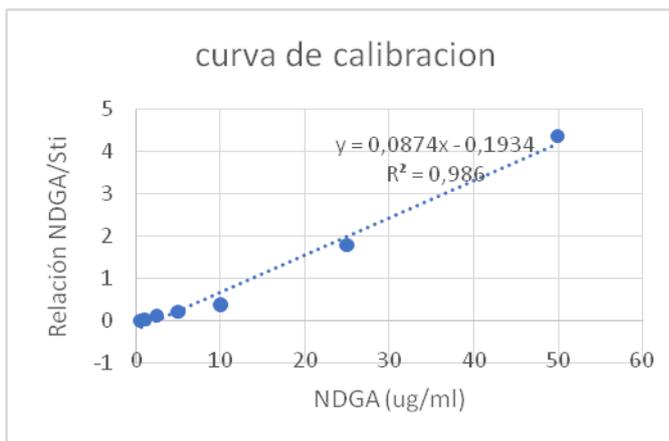


Figura 56. Curva de Calibracion (NDGA/ Std Interno)

A partir de la curva se obtuvieron los siguientes parámetros:

Precisión intraensayo

- para 10µg/ml: 5,14%
- para 50 µg/ml: 5,10 %
- para 1 µg/ml: 14,88 %

Límite de cuantificación: 0,5 µg/ml

Límite de detección: 0.2 µg/ml

4.6.1.2. Cuantificación de NDGA en ratas tratadas con ExA

Luego de administrar ExA por vía oral, la sangre de las ratas fue recolectada a distintos tiempos. Posteriormente las muestras fueron procesadas y analizadas. Se muestra a continuación, a modo de ejemplo, la corrida cromatográfica del plasma recolectado a los 30 minutos de la administración de ExA. Se puede detectar la presencia del estándar interno pero no la presencia de NDGA (Figura 57).

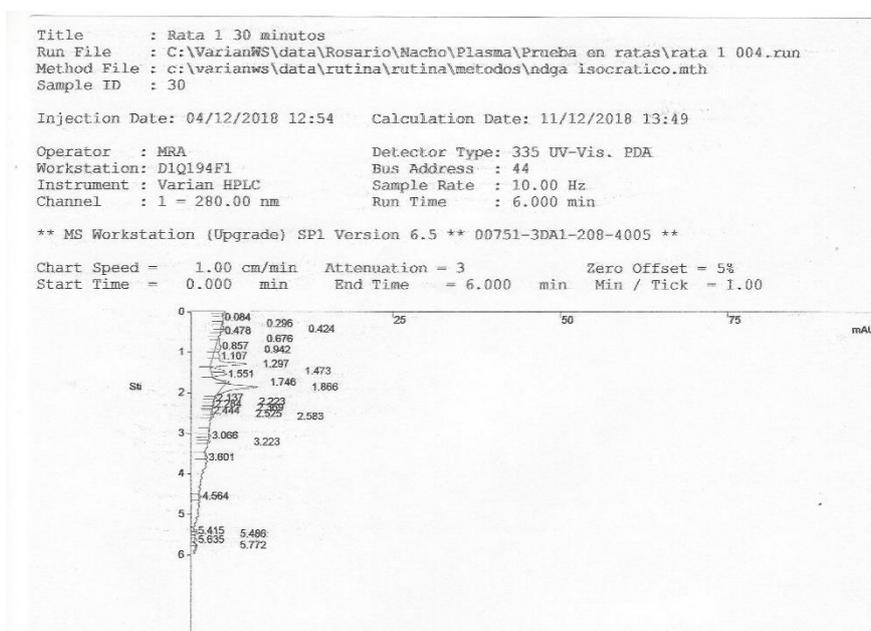


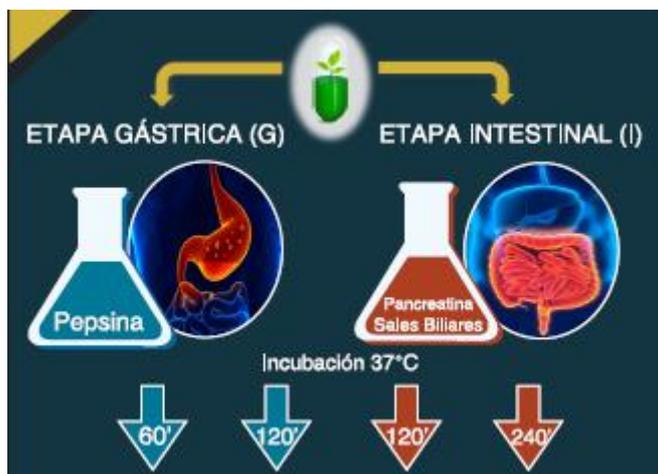
Figura 57. Cromatograma de plasma de ratas tratadas con ExA.

Tiempo de retención Estándar interno: 2,3 minutos

En ninguno de los casos fue detectable la presencia de NDGA.

4.6.2. Estabilidad y solubilidad de ExA en medio gastrointestinal.

Para este ensayo se incubaron comprimidos de ExA en condiciones similar gástrico durante 60 y 120 minutos y similar intestinal durante 120 y 240 minutos “in vitro” (según U.S.P.). A posteriori se cuantifico NDGA por HPLC; polifenoles y flavonoides por espectrofotometría y se determinó la actividad antioxidante: eliminación de ERO’s por DPPH y Poder reductor. Los resultados se muestran como porcentaje de recuperación con respecto a ExA incubado en las mismas condiciones de tiempo y temperatura sin tratamiento gastrointestinal.



El porcentaje de recuperación de NDGA fue alta, en el orden del 90% en ambos fluidos (Tabla 9).

El contenido de polifenoles totales no se modificó durante las incubaciones en medio gástrico. Luego de las incubaciones en medio intestinal durante 120 y 240 minutos, el contenido de polifenoles disminuyó un 28% y 23% respectivamente (Fig.58 A).

Los flavonoides totales disminuyeron ligeramente (12% y 18%) durante las incubaciones en medio gástrico durante 60 y 120 minutos. Al contrario, la incubación en medio intestinal provocó una marcada disminución (45% y 40%) (Figura 58 A)

La actividad eliminadora del radical DPPH y el poder reductor del extracto solo se vieron ligeramente afectados bajo condiciones intestinales, mostrando una disminución de estas actividades en un 12% o 14% respectivamente (Figura 58 B).

%	RECUPERACION DE NDGA			
	DIGESTION GASTRICA		DIGESTION INTESTINAL	
	60 min	120 min	120 min	240 min
Media	89.6	98.44	85.2	94.81
DS	3.97	3.57	3.31	2.19
CV %	4.43	3.63	3.88	2.31

Tabla 9. Recuperación de NDGA luego de la digestión simulada de ExA.

El extracto fue incubado en medio similar gástrico durante 60 y 120 minutos y en medio similar intestinal durante 120 minutos a 37C según USP. La cuantificación de NDGA se realizó por HPLC. Se expresa el porcentaje de recuperación, DS y CV% de tres o más experimentos, realizados por triplicado.

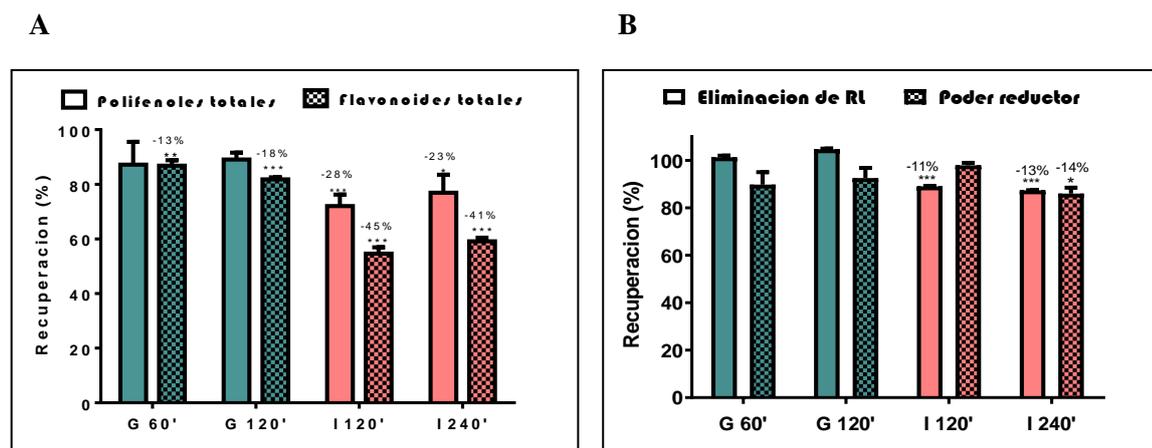


Figura 58. Recuperación de polifenoles, flavonoides (A) y actividad antioxidante (B) luego de la digestión simulada de ExA.

El extracto fue incubado en medio gástrico (G) durante 60 y 120 minutos y en medio intestinal (I) durante 120 minutos a 37°C según USP. Valores expresados como porcentaje de recuperación \pm ESM, con respecto a su control, de ensayos realizados por triplicado. Se expresa además el porcentaje de disminución, cuando corresponde. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ diferencias significativas respecto al control (100%) según ANOVA + Prueba de Tukey.

Los cambios que sufre el extracto durante el proceso de digestión simulada no afectan de manera significativa sus actividades antioxidantes.

5. DISCUSIÓN

En la introducción se mencionaron numerosos autores que han estudiado la composición fitoquímica de *Larrea divaricata* y reportaron al NDGA (flavolignano) como uno de sus compuestos mayoritarios, por lo que ha sido utilizado como marcador fitoquímico. Sin embargo, es sabido que las variables del crecimiento de la plantas (localización geográfica, factores climáticos, etc.) así como de los procesos de recolección y extracción modifican la composición de los extractos. Por la tanto, fue necesario caracterizar el extracto acuoso objeto de estudio de esta tesis. En este sentido, se desarrolló y validó un método cromatográfico por HPLC para identificar y cuantificar el NDGA. A través de este método se determinó su concentración: 0,30 g%, dato que sirvió para diseñar los estudios farmacológicos que se realizaron a continuación. También se pudo determinar la presencia y la concentración de Rutina a través de un método, siendo uno de los compuestos mayoritarios de ExA. La presencia de Rutina ha sido descrita en *Larrea tridentata* (Kuhn M. y Winston D., 2008; Ross I., 2005) sin embargo este es el primer reporte de la presencia de este flavonoide en un extracto acuoso de *Larrea divaricata*, que fue confirmado por HPLC- masa.

La determinación de los polifenoles y flavonoides totales confirma la importancia de estos grupos fitoquímicos en ExA. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los flavonoides de *L. divaricata* se presentan en su forma de aglicones, entre los que se destacan quercetina, kaempferol y apigenina (Sakakibara y col., 1976). El método cromatográfico desarrollado por el INTI identificó un derivado de la quercetina y la Floretina (primer reporte de su presencia en *Larrea divaricata*). Este último compuesto es una dihidrochalcona presente en las hojas de *Malus domestica* (manzano) y se sabe que inhibe el transporte activo de glucosa en las células por los transportadores SGLT1 y SGLT2, aunque la inhibición es más débil que la ejercida por su glucósido: florizina (Chan S. y Lotspeich W., 1962). Otro efecto importante de la Floretina es la inhibición de la absorción de glucosa por el intestino delgado (Crespy V. y col., 2001) y la inhibición de la reabsorción renal de la glucosa (Idris I. y Donnelly R., 2009).

Por otra parte, el método desarrollado por el CIDEAC también confirmó la presencia de NDGA y Rutina en ExA. Además, sugiere la presencia de derivados de la quercetina, epicatequina y los ácidos cafeico y clorogénico, confirmando los hallazgos bibliográficos.

Por último, se determinó el contenido de macronutrientes donde se destaca la presencia de fibra dietaria total, aprox. 50% y de carbohidratos, aprox. 20%.

En resumen, se logró caracterizar a ExA identificando y cuantificando algunos de sus compuestos mayoritarios, estableciendo un marcador fitoquímico: NDGA, reportando por primera vez la presencia de compuestos flavonoides: Rutina, floretina y epicatequina y determinando su composición nutricional y mineral. Este extracto acuoso de *Larrea divaricata*, así caracterizado, fue utilizado para el desarrollo de todos los ensayos presentados en esta tesis.

Para evaluar la actividad antioxidante de ExA y la participación del NDGA en dicha acción, se utilizaron diferentes metodologías que pudieran determinar si la acción era primaria o secundaria.

Según Gutteridge y Mitchel (Gutteridge y Mitchell, 1999), una acción primaria se relaciona con la prevención en la formación de radicales libres, mientras una acción secundaria se refiere a la capacidad de eliminar o neutralizar ERO's o ERN's ya formados.

Los antioxidantes de prevención impiden la formación de los radicales libres mediante la descomposición del H₂O₂ o de la quelación de los metales que participan de las cadenas redox por sus características oxido/reductoras. Mientras los eliminadores/neutralizantes de radicales libres (scavenger) inhiben el inicio de la cadena redox y rompen su propagación (Polo de Santos, 2016).

En este trabajo se realizó la evaluación de la capacidad preventiva de formación de ERO's y ERN's a través de la determinación de la capacidad reductora de metales y de las actividades símil SOD, símil CAT y símil Px. Por otro lado, la evaluación de la actividad eliminadora se realizó a través de la capacidad de eliminación del radical DPPH y a través de la neutralización de peróxidos involucrados en la lipoperoxidación y en la oxidación de proteínas.

Entre las actividades primarias ExA demostró capacidad reductora de metales como el hierro. Se sabe que el hierro juega un rol muy importante en la oxidación de los lípidos, ya que cuando estos se oxidan a hidroperóxidos los metales de transición participan en la formación de radicales alcoxilos y peroxilos pudiendo oxidar a otros lípidos e iniciando así una reacción en cadena. Por otra parte, el hierro también participa en la formación de radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno en la llamada reacción de Fenton. El radical hidroxilo es muy tóxico para las proteínas y el ADN, además de ser participe en la oxidación de los lípidos (Dorado Lambert y Montero, 2000). En este caso, ExA mostro actividad reductora del Fe en relación con su concentración. Debido a la baja actividad del NDGA no se pudo determinar su CE_{50} . Sin embargo, en la CE_{50} de ExA hay 0,75µg/ml de NDGA, que casi no presento actividad. Por lo tanto, se interpreta que esta actividad se debió a compuestos diferentes del NDGA.

Para evaluar las actividades símil enzimáticas, se enfrentó a ExA y NDGA con los sustratos de las enzimas SOD, CAT y Px y se determinó la velocidad de formación de los productos sin la presencia de las enzimas.

Así, ExA presento actividad símil SOD mostrando dos efectos máximos uno a baja y otro a alta concentración. El NDGA presentó una respuesta bifásica, ejerciendo dos efectos contrarios, de actividad antioxidante y pro-oxidante. Sin embargo, el NDGA estaría involucrado en la actividad símil SOD de ExA, ejercida a altas concentraciones, además de otros compuestos. Cuando se enfrentó la enzima SOD estándar junto a ExA y NDGA se pudo comprobar que ambos fueron capaces de aumentar la velocidad máxima de la enzima. Estos resultados demuestran que ExA podría actuar como la enzima SOD pero además potenciar su efecto. Esta enzima cataliza la dismutación del radical anión superóxido a H_2O_2 y presenta dos variantes moleculares: la Cu/Zn-SOD que se localiza en el citosol y la Mn-SOD que se localiza en la mitocondria (Gutiérrez-Salinas y col, 2014).

Complementando la actividad SOD, ExA y NDGA demostraron actividad símil Px y símil CAT en relación directa con su concentración. Esta actividad lleva a la metabolización del H_2O_2 impidiendo la transformación del mismo en especies reactivas más dañinas como el radical hidroxilo. Se sabe que este radical posee una alta reactividad, que es inversamente proporcional a su vida media, lo que indica que tiene una vida media bastante corta, debido a que reacciona de manera rápida e inespecífica con los blancos celulares más cercanos: DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos (Percario, 1991). Tiene una capacidad superior a las demás ERO's de causar daño a nivel celular, debido a que las células no cuentan con un sistema enzimático antioxidante contra este radical (Corrales y Ariza, 2012).

Con respecto a la actividad símil CAT, cabe señalar que el NDGA presento una actividad mucho mayor que la demostrada por ExA, aún en concentraciones bajas, lo que sugiere que el extracto tendría compuestos que contrarrestan la actividad de NDGA. Si bien ExA y NDGA presentaron actividad símil enzimática, en presencia de la enzima fueron capaces de disminuir la actividad enzimática. Esta disminución de la actividad de CAT puede deberse a la degradación del H_2O_2 directamente por ExA, es decir una regulación por falta de sustrato. Se podría pensar que el NDGA es el compuesto involucrado mayormente en esta actividad ya que si se comparan las respuestas máximas, ExA alcanza un máximo con 100 µg/ml y NDGA con 0,5 µg/ml, concentración contenida en 100µg/ml de ExA.

En cuanto a la actividad símil Px, teniendo en cuenta la cantidad de NDGA presente en la CE_{50} de ExA, NDGA sería uno de los compuestos activos juntamente con otros. En cuanto al efecto sobre la Px, ExA aumentó la velocidad máxima de eliminación del H_2O_2 . Este efecto se mantuvo cuando se modificaron las concentraciones de Px. Por su parte, el NDGA también aumento la velocidad máxima de la enzima, pero su efecto, si bien fue significativo, fue inferior al de ExA en ambos casos. Esto sugiere que la activación de la Px por parte de ExA se debe a la sinergia entre NDGA y otros compuestos.

En conjunto podemos decir que ExA fue capaz de proveer electrones, reducir el Fe, actuar como las enzimas antioxidantes y modular las mismas, logrando así una disminución de la formación de ERO's mayormente debido a la sinergia entre el NDGA y otros compuestos, aunque el NDGA es responsable de la activación de SOD, de la inhibición de CAT y de la actividad símil CAT.

Además, ExA y el NDGA presentaron actividad antioxidante secundaria de eliminación del radical DPPH y de peróxidos. Con respecto al DPPH, esta técnica se suele utilizar ampliamente ya que el radical DPPH es una especie reactiva relativamente estable y permite evaluar la actividad donadora de electrones.

La actividad demostrada por ExA guardó una relación directa con su concentración. En concordancia con estos resultados Micucci (Micucci y col, 2011) demostró que ExA es capaz de prevenir la oxidación de la vitamina C sometida a condiciones ambientales, a través de la eliminación del radical DPPH. Por otro lado, el NDGA también presentó actividad eliminadora del radical DPPH evaluado en las concentraciones en las que está presente en el extracto. La actividad eliminadora del radical DPPH ejercida por el NDGA también fue descrita anteriormente (Turner y col, 2007). En este trabajo de tesis esta actividad fue evaluada para analizar la participación de este en el efecto del extracto. Determinándose la cantidad de NDGA presente en la CE_{50} de ExA se deduce que el NDGA no fue el único compuesto activo y que otros compuestos se sumarían al efecto del NDGA.

Otra de las actividades evaluada fue la inhibición de la peroxidación lipídica que conjuga las dos actividades antioxidantes (primarias y secundarias).

Para determinar la inhibición de la peroxidación se utilizaron dos métodos con distintas fuentes de lípidos como sustrato de la oxidación. Por un lado, se determinó la formación de TBARS por autooxidación del ácido linoleico observándose un efecto inhibitorio en relación directa con la concentración de ExA. Al analizar las CE_{50} de ExA y NDGA se desprende que esta acción también se debe a un efecto sinérgico entre el NDGA y otros compuestos presentes en el extracto. Por otro lado, se evaluó la oxidación de los fosfolípidos de la yema de huevo desencadenada por sulfato de hierro para evaluar la peroxidación lipídica en presencia de hierro. ExA presentó actividad inhibitoria en relación directa con su concentración y en este caso no se pudo calcular la CE_{50} del NDGA por lo que comparando las concentraciones en las que se obtiene un 20% (respuesta máxima del NDGA) o la actividad mostrada por la concentración de NDGA presente en la CE_{50} de ExA podemos inferir que la actividad de ExA se debe a la presencia de otros compuestos y no al NDGA.

En este ensayo, ExA demostró efectos primarios que podrían estar relacionados con su actividad reductora de metales de transición como el hierro y de inhibición de la formación de radical hidroxilo, a través de la actividad Px y CAT, vistos anteriormente, además de efectos secundarios de neutralización de radicales hidroxilos formados durante la lipoperoxidación.

Es sabido que, en los pacientes con síndrome metabólico o diabetes, el estrés oxidativo generado lleva a la producción de AGE's (productos de glicación tardía) que comprometen el funcionamiento de las proteínas. Además, según el tipo de procesamiento al cual son sometidos los alimentos, se pro-

ducen AGE's dietarios que terminan afectando a las proteínas de igual forma que los de origen endógeno. En este sentido, buscamos determinar si ExA era capaz de prevenir la formación de AGE's dietarios simulando la fritura del huevo en aceite y observamos que todas las concentraciones ensayadas de ExA lograron inhibir la formación de AGE's y que el NDGA estaría implicado pero el efecto se debería mayormente a otros compuestos presentes en ExA. Este efecto podría estar relacionado con la inhibición de la peroxidación lipídica ya que el glioxal y metil glioxal, derivados de la lipoperoxidación, constituyen factores de carbonilación de proteínas que conducen a la formación de AGE's a través de reacciones de oxidación posteriores (Gugliucci y col, 2009).

Se sabe que la modificación por estrés oxidativo y por glicación de las proteínas y lipoproteínas es un factor asociado a la generación de aterosclerosis, complicación que se manifiesta durante las enfermedades metabólicas como la diabetes como consecuencia del gran estrés oxidativo producido (Basta y col, 2004). Es sabido que las ERO's hidrosolubles como el OH^* y O_2^{*-} se producen en zonas de inflamación crónica favoreciendo la aterosclerosis. Son los macrófagos presentes en las lesiones inflamatorias los que liberan altas concentraciones de ON, al igual que las células endoteliales y de ERO's. La combinación de ON y O_2^{*-} genera peroxinitrito que a nivel de la vasculatura afecta a las lipoproteínas, HDL, específicamente en los residuos de tirosina de las apoproteínas. Es más, Hermo y col. reportaron que la concentración de ApoA-1 nitrada aumenta en pacientes con Diabetes tipo 2 (Hermo y col, 2005). Se considera que la HDL tiene una función de protección contra la aterosclerosis porque por un lado transporta colesterol hacia el hígado, para metabolizarlo, pero además posee actividad antioxidante por estar asociada a la enzima PON-1 (Gugliucci y Menini, 2015). Esta enzima es una esterasa no selectiva con actividad lactonasa y sus sustratos son los fosfolípidos oxidados de la LDL. Estos últimos son los responsables de la acumulación de colesterol esterificado en los macrófagos (células espumosas) y el desarrollo de la lesión ateromatosa. Por lo que la HDL ejerce una función protectora de LDL y de macrófagos.

Dado que la determinación cuantitativa del colesterol asociado a HDL (usada en la clínica) resulta insuficiente para abordar la actividad anti-aterogénica de esta lipoproteína se evaluó en el presente trabajo su funcionalidad y su estructura. Teniendo en cuenta todo lo relatado y el hecho que ExA y NDGA presentaron actividad antioxidante y de prevención de la lipoperoxidación, se estudió el efecto preventivo de ExA y NDGA sobre la oxidación de PON-1 inducida por un generador de ERO's hidrosolubles como el AAPH y un generador de peroxinitritos como el SIN-1.

Tanto el AAPH como SIN-1 provocaron una disminución de la actividad PON-1, que solo fue recuperada por ExA y NDGA en presencia de SIN-1, sobre todo en las concentraciones más bajas. En el caso del tratamiento con AAPH se observa una tendencia a la reversión que no logra ser significativa, al menos en las concentraciones ensayadas. La participación del NDGA es importante en las dos concentraciones más bajas de ExA y se entiende que altas concentraciones de NDGA podrían tornarse pro-oxidantes. Esto mismo explica la incapacidad de ExA de revertir este fenómeno a altas concentraciones. Existen en la literatura varios ejemplos de extractos vegetales que protegen la función de la PON-1 (Shaik y col, 2017; Menini y col, 2007). El hecho de que las bajas concentraciones sean las más efectivas promueve la hipótesis del posible uso oral de ExA teniendo en cuenta la biodisponibilidad limitada de los extractos de origen vegetal. Se demostró entonces que ExA es capaz de proteger la función antioxidante de la HDL.

Seguidamente se estudió, por Westernblot, si la pérdida de la actividad antioxidante de la apoproteína de la HDL se debía a un efecto directo de SIN-1, a través de la agresión nitrosativa. Al revelar el blot con anticuerpos anti ApoA-1 se vio un engrosamiento en la banda de 28kDa (ApoA-1) en presencia de SIN-1 con respecto a la HDL purificada. Además, se observó la aparición de dos bandas nuevas

(56 y 84 kDa) que sugieren la agregación de ApoA-1 en dímeros y trímeros. Cuando además de SIN-1 se hicieron incubaciones con ExA se vio una marcada disminución de la intensidad de estas bandas en relación con su concentración demostrando que ExA también protege la estructura de la HDL al prevenir la agregación de la ApoA-1. Si bien el NDGA también logro disminuir la intensidad de las bandas, su efecto fue inferior al del ExA sugiriendo que la acción del extracto se debe a la sinergia entre el NDGA y otros compuestos.

Siguiendo con este razonamiento, se analizó el efecto de ExA y NDGA sobre la oxidación de LDL inducida por iones cobre (Bagheri y col, 2013). Se sabe que el Cu^{++} extrae los electrones desapareados de los ácidos grasos insaturados de la LDL generando una reacción en cadena que provoca, en última instancia, la formación de MDA (lipoperóxidos determinados como TBARS). Lo que aquí observamos fue que el Cu^{++} aumentó los TBARS de la LDL y que ExA lo revirtió en una relación inversa con su concentración. Por su parte, el NDGA revirtió el efecto del Cu^{++} con la concentración más alta y con la más baja por lo que se infiere que NDGA estaría involucrado en la actividad de la concentración más baja de ExA y que existen compuestos en el extracto que antagonizan el efecto del NDGA a altas concentraciones de ExA.

Resumiendo, podemos decir que ExA protege la función y la estructura de la HDL de la nitración lo que se relaciona con la capacidad de ExA de degradar las ERN's. Además, ExA es capaz de inhibir la oxidación de la LDL con cobre posiblemente gracias a su poder reductor de metales. Estos resultados se conectan con los estudios realizados sobre macrófagos para explicar el efecto antiaterogénico de ExA.

La actividad antioxidante general de ExA podría estar relacionada con la presencia de otros compuestos polifenólicos en los casos en que NDGA no es el único responsable. Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en frutas y vegetales y están involucrados en la inhibición de la producción de R.L. endógenos y de la progresión de patologías degenerativas mediadas por oxiradicales en humanos (Mattei y col, 2001). Es bien sabido que la actividad antioxidante de los polifenoles es su efecto más importante en los sistemas biológicos (Karakaya, 2004). Por otro lado, diferentes estudios realizados "in vitro" han demostrado una alta correlación entre el contenido de compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante de diferentes extractos (Abu-Amsha y col, 1996; Gulcin, 2006; Kono et al., 1997). Se ha visto que los polifenoles presentan actividad antioxidante principalmente secundaria (Peng Wong y col, 2006).

Se sabe que la hiperglucemia afecta el normal funcionamiento del sistema inmune y que produce estrés oxidativo y nitrosativo. Una de las células del sistema inmune innato son los macrófagos que son células inflamatorias que, entre otras, se ven afectadas por la hiperglucemia y las EROyN's conduciendo en última instancia a una deficiencia en las respuestas inmunes de tipo 1 y 2, en la memoria inmunológica y en la síntesis de IgG: inmunodeficiencia. Además, los macrófagos juegan un rol central en el desarrollo y progresión de la lesión ateromatosa y la aterosclerosis (complicaciones de la diabetes)(Tabas y Bornfeldt, 2016).

Por lo tanto, se tomó como modelo de oxidación el agregado de glucosa al medio de cultivo para evaluar el efecto antioxidante de ExA y NDGA, que ya se vio en modelos generales no biológicos.

Como signo de alteración inducida por la glucosa se estudió el efecto sobre la proliferación de los macrófagos. La glucosa produjo disminución de la proliferación celular. Este mismo efecto fue observado en linfocitos como consecuencia del estrés oxidativo inducido por la glucosa (Rubinstein y col., 2008). Mas aún, estos autores observaron que los altos niveles de glucosa en el medio de cultivo tam-

bién afectan la viabilidad celular y aumentan la apoptosis induciendo estrés oxidativo en linfocitos T y B.

Bajo estas condiciones ExA, que no modificó la proliferación de los macrófagos en condiciones basales, lo cual indica que no afectó el normal metabolismo celular, revirtió la disminución inducida por la glucosa 11 mM y por la glucosa 55mM.

Por su parte, el NDGA disminuyó la proliferación en condiciones basales, indicando una alteración del metabolismo celular. Cabe destacar que este efecto no fue observado por el extracto, probablemente por la presencia de otros compuestos que mitigaron la acción del NDGA. Sin embargo, ante el agregado de glucosa 11mM la concentración de 0,0003 $\mu\text{g/ml}$ de NDGA (presente en 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de ExA) revirtió, en menor % que ExA, el efecto de la misma. Esto indicaría que el NDGA sería uno de los compuestos responsables de esta acción además de otros compuestos. Por otro lado, cuando los niveles de glucosa fueron mayores (55mM) el NDGA no fue capaz de contrarrestar el efecto de la glucosa, esto demuestra la presencia de otros compuestos activos en ExA.

Se sabe que tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo generan un efecto citotóxico en las células y por ende llevan a una disminución de la proliferación celular. Por lo tanto, se planteó si la glucosa pudiera estar inhibiendo la proliferación de los macrófagos por inducir estrés nitrosativo por aumento en la producción de ON u oxidativo por aumento en la producción de ERO's.

Se sabe que el ON está involucrado en efectos citotóxicos y citostáticos, que llevan a una disminución de la proliferación celular además de regular el tono vascular, inhibir la agregación plaquetaria y participar en la neurotransmisión (Bredt, 1999). Una de las fuentes de producción de ON son los macrófagos, durante procesos inflamatorios, lo que llevaría a estrés nitrosativo. Como ERN es sumamente reactivo y citotóxico. Su citotoxicidad se produce por nitrosilación del hierro de proteínas sulfurdas llevando a una disminución de la energía celular, la respiración y la síntesis de ADN (Dimmeler y col, 1992). Más aún se demostró que el ON puede provocar deaminación así como ruptura de la doble y simple hélice del ADN (Nguyen y col, 1992). Muchos de los efectos del ON están mediados por el radical peroxinitrito (OONO^-) formado por la reacción del ON con el anión superóxido (Beckman y col, 1990). Más aún, el peroxinitrito reacciona con proteínas produciendo la nitración de aminoácidos tirosina, como en la SOD mitocondrial, que lleva a alterar sus funciones antioxidantes en las células. Además, la nitración de proteínas inhibe la fosforilación de proteínas relacionadas con el control de la proliferación celular (Moldogazieva y col, 2018).

Por lo tanto, se analizó el efecto de la glucosa sobre la producción de ON para ver si esta ER estaba involucrada en la disminución de la proliferación celular inducida por la glucosa y para ver si ExA y NDGA eran capaces de revertir el fenómeno.

La glucosa en todas las concentraciones ensayadas aumentó los niveles de ON en correlación con la disminución de la proliferación celular. Este aumento fue significativamente mayor con la glucosa 55mM, que produjo mayor disminución de la proliferación celular y mayor aumento de ON, que con 11mM. Estos resultados se pueden explicar por lo detallado anteriormente.

ExA no modificó los niveles basales de ON en el cultivo, y tampoco la proliferación celular, pero logró revertir el aumento provocado por ambas concentraciones de glucosa en correlación con el efecto observado en la proliferación celular. Las concentraciones más bajas de ExA fueron más activas.

Por su parte, el NDGA aumentó el ON, en la concentración más alta, en condiciones basales, hecho que puede relacionarse con la disminución de la proliferación celular que produjo. Pero en presencia de glucosa mostró una reversión, aunque, en relación inversa con su concentración. En todos

los casos, la reversión fue mayor que con las concentraciones relativas del extracto. Esto indica que el NDGA es el compuesto responsable de esta acción y que ExA posee otros compuestos que atenúan este efecto o que la disponibilidad de NDGA en ExA interfiere con su acción.

Entonces, la disminución de la proliferación celular inducida por glucosa podría ser una consecuencia del estrés nitrosativo.

Sin embargo, los macrófagos no solo son fuente de ERN's como el ON y el peroxinitrito, sino que son fuente de ERO's que conducen a estrés oxidativo. Para evaluar la participación del estrés oxidativo en el efecto de la glucosa se midieron los niveles de ERO's en presencia de glucosa y en presencia y ausencia de ExA y NDGA para ver como estos eran capaces de modular estas especies.

Cuando se analizó la producción de ERO's por citometría de flujo se vio que la glucosa aumentó estos niveles en sus dos concentraciones. Estos resultados sugieren que la disminución de la proliferación celular inducida por glucosa también estaría relacionada con el estrés oxidativo en los macrófagos y con la producción de TNF α como se explica más abajo.

Es un hecho conocido que las ERO's están involucradas en la citotoxicidad celular y por lo tanto en la disminución de la proliferación celular. Por ello, estos resultados podrían también estar relacionados con la disminución de la proliferación inducida por glucosa. Se sabe que las ERO's son generadas fundamentalmente durante el transporte de electrones en la mitocondria durante el normal metabolismo celular pero también son producidos por los macrófagos en presencia de varios estímulos incluidos el TNF α , Fas ligando y factores de crecimiento (Suzuki, 1998).

ExA disminuyó el aumento de ERO's inducido por glucosa, pero el efecto se vio en forma significativa con la concentración de 1 μ g/ml en presencia de glucosa 55 mM.

Por otro lado, la concentración relativa del NDGA, presente en EXA, no solo no revirtió el efecto de la glucosa, sino que aumentó considerablemente los niveles de ERO's. Estos resultados sugieren que el NDGA no estaría involucrado en el efecto del extracto.

Entonces, la disminución de la proliferación celular inducida por glucosa podría ser también una consecuencia del estrés oxidativo. ExA revertiría este fenómeno por poseer efecto antioxidante como consecuencia de compuestos polifenólicos diferentes del NDGA.

Los efectos de ExA y NDGA, tanto en el estrés nitrosativo como oxidativo, podrían estar mediados por su capacidad antioxidante evaluada anteriormente en sistemas no biológicos como la capacidad de eliminar radicales de oxígeno como el radical anión superóxido, que está involucrado en la activación del ON en peroxinitrito, a través de su actividad similar SOD. Además, ambos podrían estar eliminando H₂O₂ por su actividad similar CAT y Px y de esta forma evitar la síntesis del radical hidroxilo (especie altamente reactiva y toxica). Cabe destacar que, el poder reductor también podría contribuir a que no se produzca radical hidroxilo.

Entonces, ¿podrían el estrés nitrosativo y el oxidativo disminuir la proliferación celular a través de la lipoperoxidación?

Es sabido que la peroxidación de lípidos también es un indicador del sufrimiento celular por estrés oxidativo y nitrosativo, que lleva a una alteración de los fosfolípidos de las membranas y consecuentemente a un efecto de disminución de la proliferación celular por citotoxicidad, en relación con un aumento en EROyN's (Barrera, 2012).

Por lo tanto, se evaluó la peroxidación en presencia de glucosa y se analizó si ExA y NDGA podrían controlar este fenómeno. La lipoperoxidación de los macrófagos aumentó por la presencia de

glucosa 11mM y 55mM en el medio de cultivo. Este resultado guardó una relación directa con el aumento de ERO's y ERN's visto anteriormente.

ExA revirtió la lipoperoxidación con las dos concentraciones ensayadas ante glucosa 11mM, pero no modificó los valores basales ni ante la glucosa 55mM. Cabe recordar que, ante estas circunstancias, ExA también disminuyó los niveles de ERO's, pero de forma no significativa.

En este caso, el NDGA no jugaría un rol destacable ya que no modificó la peroxidación inducida por la glucosa. Cabe remarcar que cuando se evaluó la inhibición de la lipoperoxidación (act. antioxidante general) ExA mostro un efecto mucho mayor que el NDGA.

La lipoperoxidación inducida por estrés oxidativo y nitrosativo llevaría a la disminución de la proliferación celular.

ExA y NDGA inhibirían la lipoperoxidación por su actividad antioxidante detallada anteriormente inhibiendo la formación de peróxidos.

La siguiente pregunta fue: ¿Porque la glucosa indujo estrés nitrosativo y oxidativo? Esto podría ocurrir por la producción de intermediarios químicos que llevan al estrés oxidativo y nitrosativo como las citoquinas, por ejemplo TNF α , o a una disminución de moléculas protectoras y reductoras como el glutatión.

Una de las citoquinas producidas por los macrófagos es TNF α , liberada por los mismos durante la fase aguda de la reacción inflamatoria y que además promueve la liberación de ON (Fonseca y col, 2003). Por lo tanto, se quiso demostrar la interrelación entre el estrés oxidativo y la inflamación y como ExA y NDGA podrían regular ambas acciones.

Ante el agregado de glucosa la liberación de TNF α aumentó, este efecto se vio fundamentalmente con glucosa 55mM, concentración que produjo la mayor producción de ON y el mayor descenso de la proliferación celular. Esto demuestra no solo una respuesta inflamatoria inducida por la glucosa sino también el estrés nitrosativo que sería producido por el aumento en los niveles de ON.

Por otro lado, ExA no modificó los niveles de TNF α basal y mostro una respuesta bifásica en presencia de glucosa, aumentando la liberación del TNF α a bajas concentraciones y disminuyéndola a altas concentraciones. La respuesta de bajas concentraciones no coincide con la disminución de ON inducida por ExA, pero si la respuesta de las concentraciones más altas.

El NDGA no ejerció ningún efecto sobre el TNF α ni en condiciones basales ni de alta glucosa. Por lo tanto, podría pensarse que la reversión del aumento de ON lograda por ExA en bajas concentraciones está relacionada con un efecto antinitrosativo general y con su modulación sobre la Px (enzima que interviene en el metabolismo del ON) pero no se debería a una disminución de la liberación del TNF- α , mientras que el efecto de ExA a altas concentraciones sí estaría relacionado con la disminución de la liberación de TNF α . Ambos efectos no fueron debidos a la presencia del NDGA.

Hasta acá, el estrés nitrosativo (aumento del ON) estaría implicado en el descenso de la proliferación celular inducido por la glucosa y además todo esto estaría relacionado con una respuesta inflamatoria inducida por TNF- α .

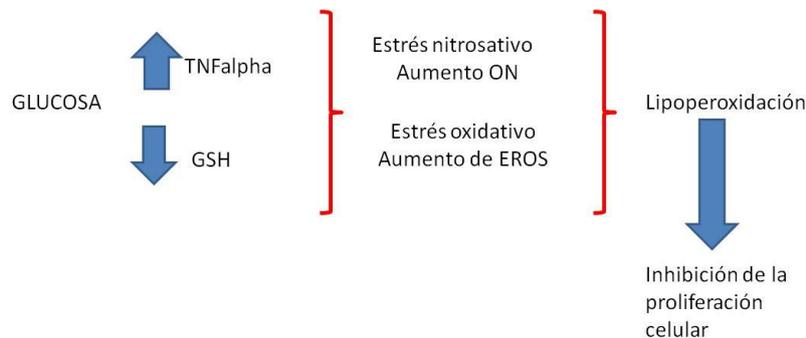
El glutatión es una molécula que al presentar grupos sulfhidrilo actúa como un antioxidante. Si bien debe estar reducido para actuar y su síntesis siempre es alta, su disminución o un aumento del glutatión oxidado son indicadores del sufrimiento oxidativo de una célula. La glucosa disminuyó los niveles de GSH. Cabe destacar que la determinación del glutatión reducido (aprox. 95% glutatión total) representa la síntesis del glutatión, y que a pesar de que no aclara cuanto glutatión oxidado se

pudo haber generado por el estrés oxidativo generado por la glucosa, la disminución del mismo provocado por la glucosa sigue siendo un factor indicador de oxidación celular (Sekhar y col, 2011).

Por su parte, ExA aumentó los niveles basales de GSH en condiciones basales (sin glucosa) con sus dos concentraciones y logro revertir el efecto de la glucosa 1 mM con su concentración de 0,1 µg/ml.

Por otro lado, las dos concentraciones ensayadas de NDGA lograron revertir la disminución de la síntesis del GSH producida por la glucosa 1 mM sin afectar la producción basal. Esto indica que el NDGA sería el responsable de la actividad de ExA frente a la glucosa, pero otros compuestos serían los responsables de la actividad de ExA en condiciones basales.

La disminución de la proliferación celular inducida por glucosa responde a una inducción de estrés oxidativo y nitrosativo que llevan a la lipoperoxidación y a la desorganización de la membrana celular. El estrés oxidativo y nitrosativo es inducido por el aumento en la producción de TNF α y la disminución de GSH.



Frente a esta situación ExA ejerció efecto antioxidante, disminuyendo los niveles de ON y de ERO's. Estas acciones fueron suficientes para impedir la lipoperoxidación y la disminución de la proliferación celular inducidas por glucosa.

El NDGA ejerció efecto sobre el ON disminuyéndolo, pero no sobre las ERO's. Estas acciones fueron insuficientes o parciales para impedir la disminución de la proliferación celular inducida por glucosa y fueron insuficientes para prevenir la lipoperoxidación.

Para confirmar el efecto de ExA y NDGA sobre el estrés nitrosativo y el oxidativo, visto anteriormente en presencia de glucosa, los macrófagos fueron sometidos a la presencia de un generador de ERO's hidrosolubles (AAPH), a un generador de peroxinitritos (SIN-1) o a una combinación de ambos para luego medir el efecto sobre citotoxicidad.

El SIN-1 es el metabolito activo de la droga vasodilatadora molisdomine. En solución acuosa da origen a ON y a O_2^{*-} (Feelisch y col, 1989; Feelisch 1991; Holm y col, 1998), cuya interacción termina formando peroxinitrito ($OONO^-$) (Singh y col, 1999). Por otro lado, AAPH, es un generador de radicales libres involucrados en la lipoperoxidación. Cuando se descompone produce nitrógeno y radicales de carbono, que pueden reaccionar con oxígeno molecular para producir radical peroxilo. El AAPH es un inductor de lipoperoxidación (He y col, 2013).

Ambas especies reactivas provocaron un aumento importante de la citotoxicidad, siendo mayor con el inductor de ERO's que con el de ERN's. Además, cuando se combinaron los inductores solo se logró ver el efecto de las ERO's sin generar sinergismos.

En condiciones basales ExA 10µg/ml demostró protección de los macrófagos frente al estrés basal del cultivo celular, mientras el NDGA aumentó la citotoxicidad.

Por otro lado, todas las concentraciones ensayadas de ExA y las relativas de NDGA previnieron la citotoxicidad inducida por SIN -1, aunque en diferente proporción. Esto sugiere la participación del NDGA en esta respuesta además de otros compuestos.

Dado que SIN-1 es un generador de peroxinitritos, como se mencionó anteriormente, es probable que la actividad antioxidante de ExA frente a este estresor esté relacionada con la actividad eliminadora de peroxinitritos del NDGA (Floriano-Sánchez y col., 2006).

Por el contrario, mientras ExA fue capaz de prevenir la citotoxicidad inducida por AAPH, el NDGA no lo hizo. Esto último sugiere que los compuestos que brindan protección frente al estrés oxidativo no sean los mismos implicados en la protección frente al estrés nitrosativo.

Nuevamente AAPH induce la formación de $O_2^{\bullet-}$, radical que podría estar siendo eliminado por la actividad símil SOD de ExA, de ahí su efecto preventivo, pero no por el NDGA que tienen muy baja actividad SOD y solo la ejerce a altas concentraciones, mayores de 1 µg/ml. Además, concentraciones menores presentan efecto prooxidante. Entre los compuestos que podrían estar previniendo el estrés oxidativo se pueden citar a los polifenoles de ExA como los flavonoides: quercetina y ácidos cafeilquínicos: ácido clorogénico, ácido cafeico entre otros, que tienen una muy bien documentada actividad antioxidante asociada a su capacidad de reducir metales (como el Fe) y de modular el sistema antioxidante enzimático (Perron y Brumaghim, 2009; Wang y Brumaghim, 2011).

Cabe remarcar que el efecto de protección por ExA fue mayor en el estrés nitrosativo que en el oxidativo, y el NDGA presentó un efecto predominante.

Otros autores demostraron el efecto del NDGA en modelos de estrés nitrosativo inducido por dicromato de potasio en ratas donde observaron su poder preventivo sobre la nitración de proteínas y de la nefrotoxicidad in vivo (Canul y col, 2008).

Ante la combinación de generadores de ERO's y ERN's la reversión de ExA y NDGA fue muy marcada, logrando bajar los niveles de citotoxicidad de un 60% a 15-20%. En este caso, vemos que el NDGA fue uno de los compuestos responsables mostrando mayor actividad que ExA en la concentración más baja.

Esto se podría explicar teniendo en cuenta que SIN-1 induce la producción de $O_2^{\bullet-}$ y ON y AAPH induce $O_2^{\bullet-}$. Este último podría estar potenciando la transformación de ON en peroxinitrito. Por lo que ExA al eliminar $O_2^{\bullet-}$, por actividad símil SOD y en conjunto con actividad símil CAT y Px, llevaría a la menor producción de peroxinitrito de SIN-1, logrando disminuir la citotoxicidad. El NDGA por su parte estaría eliminando ON lo que también llevaría a disminuir la citotoxicidad.

Estos resultados confirman el efecto antioxidante de ExA frente al estrés nitrosativo y oxidativo y la participación del NDGA principalmente en el efecto antinitrosativo de ExA, como se demostró en presencia de glucosa. Por lo tanto, el efecto antioxidante de ExA en relación a la eliminación de ERO's estaría relacionado con la presencia de otros compuestos diferentes del NDGA.

Con el objetivo de estudiar el efecto antioxidante de ExA y NDGA en otro modelo de estrés oxidativo, se probó el efecto de los mismos en glándulas submandibulares de ratas sometidas a la administración de STZ. En primer lugar, se determinó el efecto de ExA y NDGA sobre los parámetros oxidativos y antioxidantes de glándulas de animales controles para ver si ExA y NDGA eran capaces de modificar el balance antioxidante/oxidante en condiciones normales y basales

Se demostró que ni ExA ni NDGA modificaron el peso de las glándulas controles ni el contenido de proteínas, por lo tanto, todas las determinaciones fueron expresadas por peso glandular.

Seguidamente se analizó el efecto de ExA y NDGA sobre las ERO's. En la cavidad bucal el H_2O_2 es normalmente la ERO's más generada y abundante producida por los microorganismos orales, pero también se produce durante el metabolismo fisiológico por la conversión del O_2^{*-} a través de la actividad SOD (Pruitt y col, 1983; Geiszt y col, 2003).

Tanto ExA como NDGA lograron una disminución de los niveles de H_2O_2 , en las concentraciones más altas (500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de ExA). Esta disminución concuerda con la activación ejercida sobre la Px, enzima que interviene en la degradación de H_2O_2 y la disminución en la actividad SOD glandular, enzima que interviene en su síntesis, no así con la disminución de la actividad CAT. Por otro lado, la disminución del H_2O_2 por la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ no se relacionó con la modulación del extracto sobre las enzimas involucradas en la degradación y formación del H_2O_2 .

Es bien sabido que, la enzima Px y la CAT intervienen en la degradación del H_2O_2 dando agua y O_2 , mientras que SOD participa en la formación de H_2O_2 a partir del anión superóxido (Halliwell y Gutteridge, 1990). Siguiendo este razonamiento, se esperaría que el O_2^{*-} aumente, como consecuencia de la inactivación que ejerció ExA (500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad SOD (hecho que llevó a una disminución del H_2O_2) sin embargo, el O_2^{*-} permaneció disminuido probablemente porque ExA en estas altas concentraciones (no así con 100 $\mu\text{g/ml}$) pudo estar inhibiendo las enzimas que participan en la formación de O_2^{*-} , como la Xantina oxidasa, NADPH oxidasa y la lipooxigenasa. En este sentido se sabe que el NDGA es un inhibidor de dichas enzimas (Paracatu y col, 2015) lo que apoya esta teoría.

Por otro lado, el NDGA también produjo una disminución en los niveles de H_2O_2 , efecto que se relacionó con el aumento de la actividad Px y SOD glandular, pero no con la disminución de la actividad CAT, salvo con la concentración de 3,41 $\mu\text{g/ml}$, por lo que se explicó anteriormente. Más aún este resultado avala el efecto observado con el extracto sobre O_2^{*-} , con la concentración de 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, concentraciones que contienen 1,5 y 3,4 $\mu\text{g/ml}$ de NDGA, respectivamente. Queda así confirmada la participación de NDGA en la disminución del H_2O_2 y del O_2^{*-} así como la modulación de las enzimas que intervienen en el control de dichas ERO's.

Cabe destacar que el NDGA produjo mayor descenso de los niveles de H_2O_2 que ExA (en concentraciones equivalentes), probablemente porque no solo aumentó la actividad Px sino porque si bien disminuyó la actividad CAT glandular lo hizo en menor grado que el extracto, además de presentar mayor actividad similar CAT. Estos resultados indican que la CAT juega un rol importante en el control de H_2O_2 en las glándulas normales. El único caso en el no se observó relación con el NDGA fue con la disminución de la actividad CAT ejercida por ExA en la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ ya que la cantidad de NDGA contenida en esta concentración aumento la actividad.

Por otro lado, se debe discutir cómo se relacionan los efectos observados sobre las enzimas glandulares con los efectos sobre la actividad de las enzimas estándar "in vitro" (ver capítulo "antioxidante gral"). El aumento de actividad producido por ExA y NDGA sobre la Px glandular, parecería deberse a un mecanismo de activación sobre la enzima, ya que ambos aumentaron la velocidad máxima de eliminación del H_2O_2 . A esto debe sumarse el hecho de que tanto ExA como NDGA presentaron actividad similar Px. La disminución de la actividad CAT glandular, también ejercida por ExA y NDGA podría relacionarse con un mecanismo de inactivación enzimática como el producido sobre la CAT estándar, en la que se observa disminución de la velocidad máxima independientemente de la actividad similar CAT observada con ExA y NDGA. Con respecto a la actividad SOD glandular, la disminu-

ción producida parecería no estar relacionada con el fenómeno de activación observado con la SOD estándar “in vitro”. Se podrían formular varias hipótesis al respecto: como una disminución en la expresión de estas enzimas (no evaluado en esta tesis), que ExA o NDGA actúen como quelantes de cationes, que son cofactores enzimáticos, lo que llevaría a la inactivación de las enzimas o que como hay una disminución en los niveles de O_2^{*-} (sustrato) por la inhibición de NDGA sobre la xantina oxidasa y NADPH oxidasa, la enzima no actúa o presente baja actividad.

Cabe remarcar que la presencia de enzimas antioxidantes en glándulas submandibulares ha sido descrita previamente. Una de las enzimas más importantes de la cavidad bucal y secretada a partir de las glándulas submandibulares es la peroxidasa, si bien se describe la presencia de CAT y SOD, la Px juega un rol fundamental ya que protege a la cavidad bucal de la lisis producida por el H_2O_2 y OH^* . Por otro lado, la Px está involucrada en la transformación del tiocianato a ácido hipotiocianoso e hipotiocianito (dos compuestos con actividad antimicrobiana) (Carlsson, 1987). Más aún, la Px es considerada como un marcador de la funcionalidad de las glándulas salivales. Cabe destacar que, si bien ExA y NDGA tienen actividad similar enzimática, este efecto fue menor en comparación con la actividad observada en las glándulas, indicando una acción de estos sobre las enzimas o una suma de efectos.

Con respecto al ON derivado del metabolismo basal, ExA no modificó los niveles basales de ON pero si lo hizo el NDGA, que disminuyó los valores con sus concentraciones más bajas. ExA podría tener otros compuestos que se estén oponiendo al efecto del NDGA.

La oxidación de lípidos y proteínas puede producirse en condiciones basales en relación con la presencia de H_2O_2 y ON derivados fundamentalmente de la respiración celular, como se explicó en la discusión de actividad sobre macrófagos. Un gran número de respuestas intracelulares están reguladas por ERO's como: la regulación de la producción redox de ON, el estallido respiratorio de células fagocíticas mediado por NAD(P)H oxidasa, la regulación del tono vascular por ON, como sensor de cambios en la concentración del oxígeno, la regulación redox de la adhesión celular, la regulación redox de la respuesta inmune, la inducción de apoptosis, regulación de la proliferación celular entre otros mecanismos. Por lo tanto, se estudió el efecto de ExA y NDGA sobre la oxidación de lípidos y proteínas.

Tanto ExA como NDGA disminuyeron ambos fenómenos en las concentraciones que disminuyeron los niveles de EROyN's y que presentaron actividad antioxidante general, así como actividad similar Px y CAT significativa. Se podría decir que la disminución de la peroxidación lipídica y de la oxidación de proteínas por NDGA en bajas concentraciones no se debió a la eliminación del H_2O_2 ya que en estas concentraciones no modificaron los niveles de H_2O_2 pero si produjeron una gran disminución en los niveles de ON, además de aumentar significativamente los niveles de GSH. Las concentraciones más altas de NDGA contenidas en las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de ExA también disminuyeron la oxidación de lípidos y proteínas probablemente en relación con la disminución de los niveles de H_2O_2 . Cabe destacar que tanto la disminución de la oxidación de proteínas como de lípidos fue mayor con el extracto que con el NDGA, probablemente en relación con la mayor actividad antioxidante general demostrada por ExA.

Cabe remarcar nuevamente que el NDGA presentó una respuesta anti-nitrosativa muy marcada; sin embargo, no protegió totalmente a las proteínas y a los lípidos de la oxidación basal, en comparación con ExA. Efectos que fueron demostrados en macrófagos.

Entonces, tanto ExA como NDGA modularon las enzimas antioxidantes en las glándulas submandibulares de ratas en condiciones basales. El aumento de la actividad Px glandular producida por el

extracto fue consecuencia en parte por la acción del NDGA, si bien otros compuestos parecerían estar involucrados en tal respuesta. La disminución de la actividad CAT glandular producida por ExA se relacionó totalmente con su contenido de NDGA, mientras que el aumento en la actividad SOD glandular también se debió, por lo menos en altas concentraciones, al NDGA.

Para poder evaluar la actividad antioxidante en condiciones de estrés oxidativo, se utilizó un modelo de estrés oxidativo en glándulas submandibulares por la administración de estreptozotocina (STZ) en ratas (Wu y col, 2008; Turner y col, 2011) y se evaluó el estado oxidativo general de los animales así con el de sus glándulas.

Las ERO's no solo se producen en las glándulas durante situaciones fisiológicas y en infecciones sino en condiciones patológicas que cursan con estrés oxidativo como la Diabetes Mellitus. Esta reportado que los estados de hiperglucemia, característicos de la diabetes, incrementan el estrés oxidativo a través de la producción de ERO's (Hunt y col, 1988; Williamson y col, 1993). Estas ERO's están también involucradas en la injuria a diferentes órganos como el corazón, hígado y sistema nervioso central (Soko y col, 1996). Más aún, patologías bucales tales como periodontitis son alteraciones frecuentes en pacientes diabéticos (Murrah, 1985). Por otro lado, es sabido que la administración de STZ conduce a un estado símil diabetes tipo 1 en ratas (Wu y col, 2008)

Luego de 10 días, la administración de una única dosis de STZ a ratas normales provocó un desbalance bioquímico e incrementó el estado oxidativo no solamente en el plasma sino también en las glándulas submandibulares de los animales. Las ratas tratadas con STZ presentaron hiperglucemia, así como disminución de las proteínas plasmáticas. Es sabido que la STZ es una droga diabética que induce una enfermedad autoinmune que resulta en la destrucción de los islotes del páncreas, con disminución en la secreción de insulina y aumento de la glucemia (también como consecuencia de un aumento en la expresión de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), lo que lleva a una situación clínica de diabetes dentro de 2-4 días semejante a diabetes tipo I (Weiss, 1982; Perfumi y col, 1991).

La disminución del peso corporal observado en los animales tratados con STZ, se relacionó con la disminución en el contenido de proteínas plasmáticas, indicando un catabolismo corporal que llevo a una disminución del peso corporal en el orden del 45%. También se sabe que el tratamiento con STZ lleva a una severa pérdida del peso corporal (Singh y col, 2005). Esta disminución del peso corporal también fue reportada por Akbarzadeh (Akbarzadeh y col, 2007) quien observó que luego de un corto tiempo de haber sido administrada la STZ en una dosis de 60mg/kg el peso de las ratas adultas disminuyó significativamente.

Los animales tratados con STZ presentaron además disfunción hepática y renal que se manifestó por el elevado nivel de creatinina y urea, así como por el incremento en los niveles de enzimas hepáticas (AST) en comparación con las ratas control. Esta situación pudo haber sido provocada por la STZ que además de ser una droga diabética es hepatotóxica y nefrotóxica, pero también como consecuencia del estado diabético que lleva a la enfermedad hepática y daño renal (SheybaniAsl y col., 2014). Además, los animales tratados presentaron altos niveles de triglicéridos lo que es común en un estado diabético con relación a la movilización de lípidos. Numerosos autores han reportado incrementos en los niveles de lípidos así como de AST y ALT en suero de pacientes diabéticos (Singh y col, 2005; Ruzaidi y col, 2005).

En cuanto a las glándulas submandibulares, el peso de estas fue significativamente menor que los controles (disminución del 25%). Este efecto se correlaciona con la disminución del contenido proteico en las glándulas. Si bien se observó una disminución significativa del peso glandular, no se observaron cambios histológicos ni en los acinos ni en los aductos glandulares. Esto podría deberse al

tiempo en que las glándulas fueron procesadas luego de la administración de STZ. Anderson (Anderson y col, 1994) observó una reducción en la cantidad de células de los acinos de glándulas submandibulares luego de 4-6 meses de la administración de STZ y Cutler (Cutler y col, 1979) reportó una acumulación del material secretorio en el citoplasma, así como cambios degenerativos, mientras que luego de 3-12 semanas no produjeron ningún cambio.

Por otro lado, las glándulas de los animales tratados con STZ presentaron mayores niveles de MDA, como producto de la lipoperoxidación. Este incremento del 75% se correlaciona con los altos niveles de glutatión reducido. Se acepta que la hiperglucemia persistente del estado diabético conduce a un aumento en los niveles de radicales libres y de la peroxidación lipídica (Wolff & Dean, 1987). Así, altos niveles de MDA reflejan el daño de las ERO's sobre los lípidos celulares (West, 2000; Babu y col, 2006). También se ha descrito que, tanto el H_2O_2 como el O_2^{*-} producen peroxidación lipídica, oxidación del ADN y proteínas y desregulación en la síntesis de ON (Gate y col, 1999) siendo esta situación tóxica para las células de mamíferos como los fibroblastos (Tenovuo y Larjava, 1984) y células epiteliales aisladas de la mucosa oral y tejidos gingivales (Hanstrom y col, 1983). Bajo esta situación, la presencia de ERO's lleva a un aumento de las enzimas antioxidantes y al aumento de antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular como el glutatión (Mates, 2001). Cabe señalar que la administración de STZ aumentó la carbonilación de proteínas, como signo del daño de las mismas por oxidación. El incremento en grupos carbonilos (aldehídos y cetonas), que se producen en las cadenas de las proteínas (especialmente en prolina, arginina, lisina y tirosina) ha sido observado en otras patologías relacionadas con el estrés oxidativo como Alzheimer, inflamación de colon, y artritis (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El aumento en los niveles de H_2O_2 y ON inducidos por STZ demuestra que la misma produjo estrés oxidativo y nitrosativo, en relación a la lipoperoxidación y a la carbonilación producida. El incremento en los niveles de ON fue confirmado por Western blot como consecuencia del aumento de la expresión de la iNOS, enzima involucrada en la síntesis de ON. Por otro lado, el aumento en la expresión de iNOS podría ser una consecuencia del incremento de H_2O_2 , como fuera observado en procesos inflamatorios en células Caco-2 (Banann y col, 2001) y por una disminución en la actividad Px, ya que las peroxidases también están relacionadas con el metabolismo del ON (Brennan y col, 2002; Takahama y col, 2003). Por su parte, Davicino (Davicino y col, 2009) determinó que el aumento de H_2O_2 en células de linfoma (BW5147) se relaciona con un aumento en la expresión de iNOS. A su vez, el aumento en los niveles de H_2O_2 se correlaciona con la disminución en la actividad Px (enzima encargada de su degradación) y con el aumento de la actividad SOD (enzima involucrada en su formación) observada en las glándulas de animales tratados con STZ. Por otro lado, la disminución en los niveles de O_2^{*-} podría estar relacionada con la mayor síntesis de H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1990). La disminución de la actividad Px se correlacionó con la represión de la expresión de la misma (confirmado por WB). Según Klotz (y col, 2015) durante el estrés oxidativo el H_2O_2 puede activar la vía del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1/PI3K/Akt), que inactiva a la proteína FOXO, que es un factor transcripcional de la síntesis de enzimas antioxidantes. Esta inhibición podría explicar la regulación hacia abajo de la Px inducida por la STZ.

El aumento en la actividad SOD, en concordancia con los resultados de este trabajo, también fue observado por otros autores (Ibuki y col, 2010) en un estudio temporal de las enzimas antioxidantes en glándulas submandibulares de ratas tratadas con STZ. Estos autores reportan un aumento en la actividad SOD en animales sacrificados luego de 21 y 45 días de administrada la STZ. También reportan un aumento en la actividad de glutatión peroxidasa después de 7 a 21 días de la administración de STZ, en contraposición con los resultados hallados por nosotros. Una explicación de esta discrepancia puede ser que ellos midieron actividad glutatión peroxidasa y en este estudio se determinó la

actividad peroxidasa total. Sin embargo, otros trabajos concuerdan con nuestros resultados, ya que determinan que la actividad peroxidasa total disminuye en glándulas submandibulares de animales con diabetes inducida por aloxano (Anderson y Shapiro, 1979). Volviendo a los resultados obtenidos sobre la SOD, se ha demostrado la participación del H_2O_2 en la activación de Cu-Zn-SOD por oxidación crítica de grupos tioles, necesarios para su activación (Iñarrea y col., 2005). Se podría hipotetizar entonces que la activación de la SOD podría ser resultado del incremento en los niveles de H_2O_2 inducidos por la STZ.

Estos resultados comprueban que la administración de STZ provocó un estado de estrés oxidativo general que también afectó a las glándulas submandibulares, las que finalmente se usaron como modelo para analizar la acción de ExA y NDGA. Se destaca principalmente la disminución de la actividad Px glandular que llevó a aumentar los niveles de H_2O_2 en relación con la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas. Si el nivel de H_2O_2 persistiera en el tiempo (así como la disminución de la actividad Px) se esperaría la aparición de enfermedades bucales. Frente a esta situación el hallazgo de extractos o compuestos con actividad antioxidante podría ser de suma importancia para contrarrestar el desarrollo de patologías bucales.

Una vez evaluado el modelo de estrés oxidativo, se estudió el efecto antioxidante de ExA y NDGA sobre las glándulas submandibulares de ratas tratadas con STZ.

Ni ExA ni NDGA modificaron el peso de las glándulas ni su contenido proteico disminuidos por la STZ. Esto podría responder al hecho de que los estudios se hicieron "in vitro" en corto tiempo con lo cual no se dio tiempo para ver una reversión como quizás se hubiera visto con un estudio "in vivo".

Con respecto a las ERO's, la reversión lograda con ExA y NDGA sobre el aumento de H_2O_2 provocado por STZ guarda estrecha relación no solo con la actividad similar Px presentada por ambos sino también con el aumento que produjeron en la actividad de la Px glandular. Esto último podría deberse al aumento en la expresión de Px observado por WB, además de la activación directa que ambos ejercen sobre la enzima. La mayor disminución producida por el extracto, en comparación con el NDGA, sobre los niveles de H_2O_2 se correlacionó con la mayor actividad producida sobre la Px glandular y sobre la expresión de esta. Si bien el NDGA parecería estar implicado en este efecto de ExA, este tendría otros compuestos que estarían contribuyendo a su mayor efecto.

Cabe señalar que la reversión, observada con ExA y NDGA del aumento de H_2O_2 provocado por STZ también podría deberse a la reversión de la disminución de CAT que produjo la STZ. Si bien en condiciones normales (sin STZ) ExA y NDGA disminuyen la velocidad máxima de CAT, en las glándulas de los animales tratados logran revertir la disminución producida por STZ. Esto puede deberse a un aumento en la expresión de la enzima (fenómeno no estudiado en esta tesis) como sucede con la Px independientemente del efecto inhibitorio observado en los estudios realizados sobre la CAT pura.

Con respecto al anión superóxido, tanto ExA como NDGA reversionaron la disminución en los niveles de este provocados por la STZ. Estos resultados se correlacionaron con la disminución de la actividad SOD glandular producida por ambos, es decir, al haber menor actividad SOD y producirse menor cantidad de H_2O_2 aumentarían los niveles de $O_2^{*\cdot}$ (sustrato de la SOD), efecto que también se produjo en animales controles. Una hipótesis planteada sería la quelación de cationes que actúan como cofactores de la enzima, como ya se explicó anteriormente, lo que conduciría a la inactivación enzimática.

Por otro lado, la producción de GSH sigue aumentada en presencia de ExA y NDGA en animales tratados con STZ, como un mecanismo de defensa frente al estado oxidativo inducido por la STZ.

Con respecto al ON, la reversión en el aumento de los niveles ejercido por ExA y NDGA en los animales tratados con STZ se correlaciona con la disminución en la expresión de iNOS inducida por ambos. Cabe destacar que el efecto producido por ExA fue 2 veces superior al ejercido por NDGA, indicando la presencia de otros compuestos activos en el extracto además del NDGA.

Además, tanto ExA como NDGA revirtieron la oxidación de lípidos y de proteínas inducida por la STZ, hecho que se relaciona con la disminución de las EROyN's, principalmente H₂O₂ y ON además de la actividad antioxidante general que presentan ambos (ver inhibición en la formación de TBARS). Nuevamente cabe señalar que el efecto de ExA fue entre 1,12 y 4,7 veces mayor que el ejercido por el NDGA. Estos resultados sugieren la presencia de otros compuestos que actuarían en sinergia con el NDGA.

El hecho de que extractos de plantas puedan modificar la actividad enzimática en tejidos y ejercer actividad antioxidante también fue observado por otros autores.

Así se describe que un extracto de *Allium sativum* presenta actividad antioxidante aumentando la actividad SOD, Px y CAT en sangre y en homogenato de tejido miocárdico, luego de someter a ratas a diabetes experimental con STZ (Naderi y col, 2015). Extractos de hojas de *Calophyllum inophyllum* también demostraron actividad antioxidante, incrementando la actividad de enzimas antioxidantes CAT, Px, SOD en plasma de animales con diabetes inducida por STZ (Varsha y col, 2016)

En conclusión y en comparación con los resultados obtenidos en macrófagos, ExA fue capaz de revertir el estado oxidativo inducido por la STZ en las glándulas submandibulares, caracterizado por el aumento de oxidación de proteínas y lípidos, a través de la modulación de las enzimas antioxidantes, principalmente la Px. El NDGA sería uno de los compuestos activos, pero no el único involucrado en la acción de ExA.

Para analizar el efecto de ExA sobre la glucemia y el estrés oxidativo en un modelo "in vivo" de ratones con diabetes inducida por la administración de STZ, primero se realizó un estudio sobre la toxicidad sub-crónica en animales sanos para garantizar la inocuidad del extracto.

Trabajos previos del grupo de trabajo sobre la toxicidad sistémica y local, así como la toxicidad aguda y parte de estos resultados acerca de la toxicidad sub-crónica fueron publicados (Peralta y col, 2015).

Con respecto a la toxicidad aguda, el extracto presento baja toxicidad ya que la DL₅₀ de ExA es de 4,4 g/kg, por lo que se lo considera no toxico (Kennedy y col, 1986) y no mostro ningún signo de irritación local ni dérmica u ocular.

Cuando se realizó el ensayo de toxicidad sub-crónica, con excepción del número de eosinófilos, los parámetros hematológicos y bioquímicos permanecieron dentro del rango de referencia para los animales control, ya que no se observaron cambios significativos entre los grupos. El análisis de los parámetros sanguíneos es relevante para la evaluación del riesgo, ya que cualquier cambio en los sistemas hematológicos o bioquímicos tiene un mayor valor predictivo para la toxicidad humana, cuando los datos se extrapolan de estudios en animales (Olson y col, 2000)

Los eosinófilos se localizan en los tejidos conectivos bajo la capa epitelial de la piel, los bronquios, el tracto gastrointestinal y la pared del útero (Rytomaa, 1960). En individuos sanos, solamente un pequeño número de eosinófilos circula en la sangre donde permanecen por un corto periodo (3 a 8hs) antes de entrar a los tejidos. Se produce eosinofilia de la sangre y de los tejidos en individuos con enfermedades alérgicas o con infecciones por helmintos (Dessein y col, 1982). Se sabe que los eosinófilos secretan una variedad de mediadores que podrían afectar el desarrollo de la inflamación y

están involucrados en reacciones alérgicas. Los más importantes de estos mediadores son los metabolitos del ácido araquidónico: ácido 5-hidroxicicosatetraenoico (5-Hot) y leucotrieno C₄ (LTC₄) (Weller y col, 1984) que están implicados en el reclutamiento de otros eosinófilos. Algunas drogas tales como corticoesteroides inducen eosinopenia asociada a la inhibición de la síntesis de leucotrienos y por lo tanto del reclutamiento de las células (Thorn y col, 1950). Por otro lado, los ratones tratados con NDGA también presentaron eosinopenia. Se sabe que el NDGA es un inhibidor de la 5-lipooxigenasa (West y col, 2004), por lo que podría estar implicado en la eosinopenia inducida por ExA a través de la disminución en la síntesis de leucotrienos. Es importante remarcar que, debido a que el extracto no modificó el nivel de las aminotransferasas (ALT), el colesterol ni la creatinina, que son indicadores de las funciones hepáticas y renales (Hilaly y col, 2004) y no indujo ningún daño histológico en estos órganos, se confirma la hipótesis de que el extracto no es tóxico para estos órganos.

Estos resultados muestran que el extracto no presentó toxicidad luego de su administración durante 28 días consecutivos. Sin embargo, se ha atribuido toxicidad hepática al NDGA. El NDGA fue utilizado hasta hace un tiempo como antioxidante para evitar la oxidación de la manteca y grasas, pero la FDA prohibió su uso. En los estudios de toxicidad realizados con el extracto y con las dosis de NDGA presentes en las dosis de extracto ensayadas, no se manifestó esta toxicidad, porque las concentraciones del mismo en el extracto son bajas, en 1000 mg/ml de extracto hay 3-4 mg/ml de NDGA. Además, podría pensarse que en un extracto crudo otros compuestos, como los presentes en ExA, podrían modular los efectos adversos del NDGA. Además, está comprobado que el NDGA en concentraciones bajas es capaz de ejercer actividad antioxidante protegiendo a los tejidos de diferentes agresiones. Por ejemplo, cuando las concentraciones son bajas, el NDGA presenta efectos beneficiosos como la inhibición de enzimas que participan en procesos oxidativos además de actividad antimicrobiana, por otro lado, ejerce efecto protector de la neurotoxicidad y toxicidad de vejiga (Goodman y col, 2001; Shishido y col, 2001), actividad anticancer y efectos antimutagénicos (Huang y col, 2004; Hofmanova y col, 2002; Seufferlein y col, 2002).

Teniendo en cuenta la actividad antioxidante de ExA en modelos “in vitro” biológicos y no biológicos, como en las glándulas submandibulares de ratas diabéticas, se decidió estudiar el efecto antioxidante “in vivo” de ExA, además de su efecto sobre la glucemia, en un modelo de diabetes inducido por la administración de STZ en ratones (Wu y Huan, 2008).

Una vez establecido el diagnóstico de diabetes en los animales, principalmente por los niveles de glucemia alcanzados, se administró el extracto por la vía oral y la vía intraperitoneal (en grupos separados) dado que la forma de administración de las drogas es uno de los factores que más afectan los resultados de los métodos “in vivo”. Se seleccionó la vía intraperitoneal debido a que presenta una rápida absorción y la vía oral pensando en un posible uso de ExA como coadyuvante del tratamiento de la diabetes. Si bien la vía oral puede resultar menos ventajosa debido a que la biodisponibilidad y/o actividad de los compuestos puede verse afectada por una serie de factores como una variación en su absorción por la presencia de alimentos, modificación química debido al pH del estómago y metabolización parcial o total por efecto del primer paso hepático, los resultados de esta tesis confirman la estabilidad, la solubilidad y la actividad del extracto después de la digestión en un medio similar gastrointestinal, y como discutiremos a continuación esto se correlaciona con el hecho de que ExA mantenga su actividad en este ensayo “in vivo”.

Luego de la administración de la STZ, se determinó periódicamente el peso corporal de cada animal, así como su glucemia. Una vez terminado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se les extrajo sangre para determinar triglicéridos, colesterol total y lipoperóxidos determinados como

TBARS. También se realizaron análisis histopatológicos de páncreas, hígado y riñón por ser los órganos frecuentemente afectados por la patología diabética.

En primer lugar, se consideró el efecto de ExA, por ambas vías, en condiciones basales de animales controles, no tratados con STZ y observamos que, a excepción de la disminución de la lipoperoxidación provocada por la administración oral, ExA no modificó significativamente ninguno de los otros parámetros: glucemia, colesterol, triglicéridos basales.

Si bien ya se había demostrado el efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica de ExA “in vitro”, el hecho que solo la administración oral haya disminuido las TBARS podría deberse a una disminución de la absorción de lipoperoxidos dietarios más que a un efecto sobre la producción endógena basal.

Cuando se administró la STZ se provocó una alteración química de las células β del páncreas productoras de insulina. Así, en este grupo se observó que la glucemia aumentó sostenidamente hasta superar los 150 mg/ml, hecho que se produjo a los 20 días de administrada la primera dosis de STZ. Cabe recordar que el diagnóstico de diabetes se realiza al observar dos glucemias consecutivas por encima de los 126 mg/ml (American Diabetes Association, 2010; Ministerio de Salud R.A., 2012). Fue en ese momento que se decidió empezar el tratamiento con ExA (día 0). Es sabido que la administración de STZ genera catabolismo proteico y pérdida de peso corporal durante las primeras semanas de su administración (como ya se discutió en el modelo de glándulas submandibulares). Esto se puede correlacionar con el menor y más lento aumento del peso observado en el grupo STZ con respecto al control.

Por otro lado, se hizo evidente el aumento de los triglicéridos, del colesterol y de la lipoperoxidación. Estos fenómenos están asociados íntimamente con la diabetes. Por último, el análisis histopatológico sugirió una disminución en el tamaño de las células de los islotes pancreáticos confirmando la acción de la STZ. Sin embargo, no hubo diferencias histológicas en los hígados ni en los riñones de estos animales con los controles. En el estudio previo de administración de STZ, modelo de glándulas submandibulares, se evidenciaron alteraciones hepáticas y renales al analizar marcadores bioquímicos. Es posible que para observar modificaciones histológicas se requiera un desarrollo crónico de la enfermedad. Estos resultados demostraron el desarrollo de una enfermedad de tipo diabética y el consiguiente estrés oxidativo generado por la administración de STZ. Por lo tanto, se analizó el efecto de ExA bajo estas condiciones.

El objetivo primario de este estudio fue analizar el efecto antioxidante de ExA, pero los resultados demostraron además su capacidad de disminuir niveles de glucemia aumentados en los ratones diabéticos que fue mayor por vía oral (33%) que por vía i.p. (13%) en las primeras semanas del tratamiento. Cuando fue administrado por vía oral, ExA provocó un descenso de la glucemia por debajo de los 126 mg/ml (similar a los valores del grupo control) que pudo mantener durante dos semanas. Al ser administrado por vía i.p. este efecto solo se mantuvo una semana y no fue tan significativo. Este hallazgo no había sido reportado previamente por ningún autor, si bien se sabe que una planta de la misma familia que crece en México y Estados Unidos (*Larrea tridentata*) ha sido usada popularmente como antidiabético (Winkelman, 1989). Teniendo en cuenta que la hiperglucemia provoca un aumento de las EROyN's y por consiguiente un aumento de la peroxidación lipídica, la reversión del aumento de los TBARS lograda por la administración por ambas vías de ExA se podría relacionar, no solo con los efectos antioxidantes demostrados en otros modelos, sino con el efecto hipoglucemiante del mismo. Por lo tanto, se confirma el efecto antioxidante relacionado en este caso con un efecto hipoglucemiante en el contexto del estrés oxidativo provocado por la hiperglucemia inducida por STZ.

Más aún, el metabolismo lipídico también se vio favorecido por el tratamiento con ExA. Cuando se administró por vía i.p., ExA revirtió el aumento en los triglicéridos y cuando fue administrado por vía oral, revirtió el aumento del colesterol total. Como ya se discutió previamente, ExA protege a las lipoproteínas de la oxidación por varios mecanismos además de disminuir su concentración plasmática.

Al analizar el peso corporal de los animales, vimos que la administración i.p. de ExA impidió la recuperación del peso luego del descenso provocado por STZ y que por vía oral lo disminuyó aún más. Si bien parece que la administración oral de ExA prolonga el efecto de STZ y aumenta la diferencia con respecto a los animales control, esta acción podría ser beneficiosa en pacientes con Diabetes tipo 2 con sobrepeso y/u obesidad asociada, no así en pacientes con Diabetes de tipo autoinmune que presentan bajo peso.

A continuación, se discutirá el posible mecanismo de acción de ExA.

En el tratamiento convencional de la Diabetes se utilizan diferentes drogas hipoglucemiantes como las sulfonilureas y las meglitinidas, y drogas antihiperoglucemiantes como las biguanidas, los inhibidores de la glucosidasa, la exenatida (análogo GPL-1), los inhibidores de la dipeptil-peptidasa-4 (DPP-4) y las glitazonas. Las sulfonilúreas (glipizida, gliburida y glimepirida) y las meglitinidas (repaglinida y nateglinida) estimulan las células beta del páncreas para que liberen más insulina. Las biguanidas (metformina) reducen la cantidad de glucosa que produce el hígado y hacen que el tejido muscular sea más sensible a la insulina, de modo que la glucosa pueda absorberse. Las tiazolidinedionas (rosiglitazona, troglitazona y pioglitazona) ayudan a que la insulina funcione mejor en el músculo y en el tejido adiposo, y también reducen la producción de glucosa en el hígado. Los inhibidores de las alfa-glucosidasas (acarbosea y miglitol) bloquean la descomposición de almidones en el intestino y reducen el ritmo de descomposición de algunos azúcares, impidiendo su absorción. Debido a que actúan de diferentes maneras, estos medicamentos pueden utilizarse de manera conjunta (Salvador Escorcía, 2009). Las drogas con acción hipoglucemiante suelen producir numerosos efectos adversos en relación al descenso de glucosa por debajo de los niveles basales como: temblor de labios y lengua, hambre, náuseas, disminución de función cerebral, letargia, confusión, agitación y nerviosismo, aumento de la actividad simpática (taquicardia, sudoración y temblor) y finalmente convulsiones, estupor y coma. Los ancianos son más sensibles a los efectos del fármaco por reducción en su metabolismo y eliminación. La insulina produce hipoglucemia y las sulfonilúreas producen hipoglucemia y aumento de peso; las tiazolidinedionas aumentan el riesgo de insuficiencia cardíaca, producen aumento de peso, mayor tendencia a fracturas en mujeres y hepatotoxicidad; las meglitinidas aumentan el peso y llevan a hipoglucemia; las biguanidas producen trastornos gástricos como dolor abdominal, náuseas, diarrea, sin provocar hipoglucemia; la exenatida produce náuseas, vómitos, diarreas y pancreatitis y los inhibidores de la α glicosidasa producen flatulencia (Goodman y Gilman, Ed. 12, 2012).

La disminución de los niveles de glucemia inducida por ExA solo se manifestó cuando los valores de la misma estaban aumentados por encima del basal (animales diabéticos) y en ningún caso disminuyó estos valores por debajo de los basales (en animales controles). Todo esto indicaría que el extracto es antihiperoglucemiante más que hipoglucemiante. Este efecto podría relacionarse con la reducción de glucosa producida en el hígado, con el aumento de la sensibilidad de los tejidos a captar glucosa o a una disminución en la absorción de la misma.

En este sentido, debido a su composición ExA podría actuar a través de diferentes mecanismos. Por un lado, se determinó en ExA la presencia de fibra soluble. La fibra soluble está dada por la presencia de mucilagos, pectina, y gomas. Es sabido que la fibra soluble disminuye la glucemia al inhibir la absorción intestinal de glucosa, pero también disminuye los triglicéridos y el colesterol (Lattimer,

2010). Por ejemplo, la goma guar, endosperma pulverizado de la planta *Cyanopsis tetragonolobus*, presenta una alta viscosidad en relación al contenido de fibra soluble representada por polisacáridos no absorbibles (galactomanano), que se caracterizan por retrasar y disminuir la absorción de hidratos de carbono de absorción rápida como la glucosa. Su efecto se refleja como una disminución de la hemoglobina glicosilada. Impide que se produzcan picos postprandiales, disminuyendo los requerimientos de insulina y fármacos antidiabéticos. Todo esto hace que la misma sea utilizada como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes. La goma guar no es un hipoglucemiante sino un anti-hiperglucemiante. Por lo tanto, no produce picos hipoglucémicos ni efectos metabólicos de antidiabéticos convencionales y está indicada como tratamiento antidiabético en pacientes en que no es posible conseguir un adecuado control glucémico con las medidas terapéuticas habituales (dieta, insulina o antidiabéticos orales).

En este sentido la disminución del peso, del colesterol y de los triglicéridos y de la glucemia provocados por ExA podría relacionarse con el contenido de fibra vegetal soluble (presente en un 50% aprox.).

Por otro lado, ExA presenta polifenoles en su composición entre los cuales se describieron flavonoides como quercetina, quercetina-3 metil éter y lignanos como NDGA, entre otros.

Se conoce que los flavonoides disminuyen los niveles de glucemia por diferentes mecanismos en relación a la cantidad, tipo y posición de los residuos glicosilados que presentan (Pereira y col., 2011). Uno de los mecanismos descritos es la inhibición de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Así se le atribuye actividad anti-hiperglucemiante, en ratas diabéticas, a un extracto acuoso y otro etanólico de *B monandra* por la presencia de flavonoides.

Se ha demostrado que flavonoides como kaempferitina, y kaempferol 3- neohesperidosido son capaces de estabilizar los niveles de glucemia en ratas diabéticas. Por otro lado, los flavonoides quercetina y rutina activan hexoquinasas y glucocinasas al mismo tiempo que inhiben la glucosa 6-fosfatasa hepática y la glucógeno fosforilasa. Shimizu y col. (2000) demostraron que también estos flavonoides son capaces de disminuir la absorción de la glucosa. Según Pereira y col. (2011) la disminución de la absorción de glucosa se debería a una inhibición del transportador de glucosa dependiente de sodio. A la rutina también se le atribuyen otras actividades antiglucémicas como incremento en los niveles de insulina, péptido C, restauración de niveles de glucagón, actividad hexoquinasa y disminución de actividad glucosa 6 fosfatasa y fructosa 1,6 bifosfatasa.

Por otro lado, el efecto antioxidante de los polifenoles también está involucrado en la actividad anti-hiperglucemiante. Sabu y col. (2002) demostraron que los polifenoles presentes en un extracto acuoso de *Camelia sinensis* están involucrados en la disminución de la glucemia en diabetes inducida por aloxano en ratones. Aún más, se demostró que un extracto acuoso de té verde disminuye la glucosa plasmática a través de la inhibición de la peroxidación hepática (Mendez y Bogle, 2015).

Algunos trabajos indican que los polifenoles contenidos en el té negro ayudarían a la regeneración de las células beta pancreáticas a través de su actividad antioxidante eliminando las especies de oxígeno y nitrógeno entre ellas, oxígeno singulete, anión superóxido y anión radical hidroxilo lo que explicaría su capacidad de disminuir los niveles de glucosa (Nirmalya y col., 2015).

Kobayashi y col. (2000) demostraron que las catequinas como la epigalocatequina galato presente en el té verde, además de presentar actividad antioxidante, disminuye la captación de glucosa intestinal por interacción con un transportador de glucosa sodio dependiente logrando disminuir los niveles de glucosa. Más aún, Wu y col. (2004) demostraron que la disminución en los niveles de glucosa in-

ducidos por té verde se relaciona con el incremento en la síntesis del transportador de glucosa GLUT 4.

Otros autores demostraron que polifenoles aislados de *Penthorum chinense*, están involucrados en la disminución de los niveles de glucosa en ratas diabéticas a través de la secreción de insulina (Huang y col., 2015; Nimse & Pal, 2015).

También se ha reportado que el NDGA presenta acción en la modulación de los niveles de glucemia. Se ha visto que el NDGA es capaz de disminuir la glucemia, en ratones en dos modelos de diabetes tipo II (Luo y col., 1998). También presentó actividad en un modelo de diabetes de tipo II inducido en ratas alimentadas con lípidos y tratadas con STZ, con un efecto similar a la metformina. En este trabajo se demostró que el NDGA aumenta la disposición de la glucosa y la lipólisis (Reed y col., 1999). La concentración de NDGA utilizada en estos trabajos fue de entre 0,08-0,25 g/kg/día. Teniendo en cuenta la cantidad de NDGA presente en 1 g/kg/día de ExA, como se ensayó en este trabajo de tesis, la cantidad administrada equivaldría a 0,003 g/kg/día de NDGA, es decir entre 25-100 veces menor a las utilizadas en diferentes trabajos. Por lo tanto, es poco probable que el NDGA esté involucrado en este efecto, aunque podría sumarse al efecto de otros compuestos.

Teniendo en cuenta que la aterogénesis, la hiperglucemia y la alteración en la funcionalidad de los macrófagos son consecuencia del estrés oxidativo durante las complicaciones de la diabetes, y que ExA ejerce actividad antioxidante en relación con la inhibición de la peroxidación, la protección de las LDL, de los macrófagos ante altas concentraciones de glucosa, y la protección de las glándulas salivales de ratas diabéticas, sumado a la baja toxicidad del mismo, sostiene la hipótesis de que ExA podría ser usado como coadyuvante terapéutico no solo para evitar las complicaciones de patologías oxidativas sino también para controlar la glucemia y el metabolismo lipídico en enfermedades con síndrome metabólico como la diabetes.

Finalmente, ExA presentó estabilidad en medio gástrico ya que el NDGA, los polifenoles y flavonoides totales se mantuvieron en un porcentaje alto. El aumento del % de NDGA recuperado, observado a los 120 min en medio gástrico, podría estar relacionado con la mayor solubilidad del NDGA alcanzada luego de prolongarse la incubación. Cabe destacarse que el NDGA es una molécula poco soluble en medio acuoso, por lo que se ha de suponer que la misma aumenta con el tiempo de exposición al solvente. Estos resultados también se condicen con la actividad antioxidante, la que es mantenida sin modificarse.

Por otro lado, en medio intestinal los flavonoides y polifenoles totales se vieron afectados. Algunos trabajos demuestran la inestabilidad de flavonoides en determinados pH y frente a la presencia de metales y ciertas enzimas (Xiang y col., 2017). Esta alteración en medio intestinal hizo que el poder reductor y la capacidad de eliminación de radicales se viera afectada, pero en menor grado. Probablemente por la presencia del NDGA, que no se modificó y pudo compensar la degradación de flavonoides.

A pesar de haber desarrollado y validado un método robusto para la determinación de NDGA en plasma de rata, no se detectó su presencia en esa matriz luego de administrar ExA por vía oral, por lo que no se pudieron calcular las constantes farmacocinéticas. Dado que el NDGA se mantuvo estable en el ensayo de digestión gastrointestinal simulada las diferentes variables farmacocinéticas (no evaluadas en esta tesis), como la absorción y metabolización del NDGA, pueden ser responsables de este fenómeno. Una lenta absorción o una rápida metabolización pueden haber evitado una concentración plasmática de NDGA dentro del límite de detección. Para confirmar esta hipótesis se debería realizar

DISCUSIÓN

el mismo ensayo administrando ExA por vía endovenosa, evitando así el primer paso hepático y/o realizar estudios de absorción y metabolización microsomal.

Sin embargo, ExA demostró su actividad en modelos in vivo. Por lo que se puede asumir que dichas actividades se deben a la presencia de otros compuestos (como ya se discutió oportunamente) o de metabolitos activos del NDGA.

CONCLUSIONES

- Se confirmo y cuantifico la presencia de NDGA y Rutina en ExA.
- ExA presenta una importante cantidad de polifenoles dentro de los que se destacan los flavonoides. En este caso se identificó la presencia de Dihidroquercetina, Quercetina-3-O-arabinopiranosido, Quercetina-3-O-galactosido, Floretina y Epicatequina. También se detecta la presencia de ácido clorogénico y ácido cafeico.
- Esta tesis constituye el primer reporte de la presencia de Floretina, Epicatequina y Rutina en un extracto acuoso de *Larrea divaricata* Cav.
- Se determino la composición nutricional y mineral de ExA.

- ExA presentó actividad eliminadora de radicales libres, actividad preventiva en la oxidación de ácido linoleico y de los fosfolípidos del huevo y actividad preventiva de la formación de AGE's. Estas actividades se deben a la acción de NDGA y de otros compuestos presentes en ExA.
- ExA presentó actividad reductora de metales y su actividad se debió a compuestos diferentes al NDGA.
- ExA presento actividad símil SOD y símil Px y el NDGA es el responsable de esta respuesta junto a otros compuestos presentes en ExA.
- ExA presento actividad símil CAT y el NDGA es el compuesto responsable pero además el extracto presenta otros compuestos que podrían oponerse a este efecto
- ExA aumento significativamente la velocidad máxima de Px y SOD estándar mientras que disminuyo la velocidad máxima de CAT. El NDGA es el responsable de la acción sobre SOD y sobre la CAT, pero otros compuestos también están involucrados en la acción sobre Px.
- Concentraciones bajas de ExA revirtieron la disminución de la actividad PON-1 de la HDL provocada por SIN-1. El NDGA está involucrado en esta acción.
- ExA disminuyo la formación de dímeros y trímeros de la ApoA-1 durante la nitración de la HDL con SIN-1. El NDGA es uno de los compuestos involucrados en esta acción.
- ExA revirtió el aumento en la formación de TBARS en LDL causado por Cu⁺⁺ en relación inversa con su concentración. El NDGA está involucrado en la actividad de las concentraciones más bajas del extracto.

- ExA revirtió el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular inducida por la glucosa. Este efecto se debe a la presencia de compuestos diferentes al NDGA.
- ExA revirtió el aumento en la producción de ON provocado por la glucosa. El NDGA es uno de los compuestos involucrados en esta acción y otros compuestos presentes en ExA contrarrestan la actividad del NDGA.
- ExA revirtió el aumento de la producción de ERO's provocado por la glucosa. El NDGA no está involucrado en esta acción.
- ExA revirtió el aumento en la producción de TBARS inducido por la glucosa. El NDGA no está involucrado en esta acción.
- ExA presentó una respuesta bifásica ante el aumento de la producción de TNF- α inducido por glucosa que no se corresponde con su contenido de NDGA.
- ExA aumento la producción de GSH en condiciones basales y revirtió la disminución de los niveles de GSH producidos por alta glucosa. El NDGA está involucrado en este efecto, pero no es el único responsable.

- ExA revirtió la citotoxicidad inducida por SIN-1 y AAPH. El NDGA está involucrado en la reversión del efecto provocado por estrés nitrosativo (SIN-1).

En Glándulas Submandibulares provenientes de Ratas Normales:

- ExA fue capaz de disminuir los niveles basales de H_2O_2 y O_2^{*-} en relación con la presencia de NDGA.
- ExA disminuyó la oxidación de proteínas y la lipoperoxidación basal en relación a la presencia de NDGA y otros compuestos presentes.
- ExA aumentó la actividad Px en relación al contenido de NDGA y de otros compuestos presentes; disminuyó la actividad SOD y CAT en relación con el NDGA y aumentó la actividad GR sin guardar relación con el NDGA.
- ExA aumentó los niveles de GSH sin guardar relación con la presencia de NDGA.

En Glándulas Submandibulares provenientes de Ratas Diabéticas:

- ExA revirtió por completo el aumento en los niveles de H_2O_2 provocado por STZ. El NDGA es uno de los compuestos involucrados en esta acción.
- ExA logro revertir la disminución de los niveles de O_2^{*-} provocada por STZ. El NDGA es el compuesto responsable de esta acción.
- ExA revirtió el aumento de ON provocado por STZ y NDGA es responsable de esta acción junto a otros compuestos.
- ExA revirtió el aumento en la oxidación de lípidos y proteínas provocado por STZ. Otros compuestos además del NDGA estarían involucrados en esta acción.
- ExA revirtió el efecto de STZ sobre la Px, CAT y SOD, el NDGA podría ser uno de los compuestos involucrados además de otros compuestos.
- El tratamiento con STZ disminuyo la expresión de Px mientras que aumento la expresión de iNOS. ExA logro revertir el efecto de STZ y el NDGA podría estar involucrado en esta acción.

En Ratones Sanos:

- ExA no presenta toxicidad sub-crónica.
- La administración de ExA por vía oral e i.p. no modifica la glucemia ni el peso corporal

En Ratones con Diabetes Inducida

- La administración oral de ExA revirtió el aumento de la glucemia inducido por STZ durante las primeras dos semanas de tratamiento, manteniendo los niveles por debajo de 150 mg/ml; disminuyo el peso corporal; revirtió el aumento del Colesterol y de la formación de TBARS inducidos por STZ y aumento la producción de GSH.
- La administración intraperitoneal de ExA impidió la recuperación del peso corporal; revirtió el aumento de los Triglicéridos y de la formación de TBARS provocados por STZ y disminuyo la producción de GSH

Estudios Farmacocinéticos

- No se detecta la presencia de NDGA en plasma luego de la administración oral de ExA.
- Los cambios que sufre el extracto durante el proceso de digestión simulada no afectan de manera significativa sus actividades antioxidantes.

RESUMEN

El estrés oxidativo es causa y consecuencia de numerosas patologías que presentan elevada morbi-mortalidad en la población mundial, como por ejemplo la Diabetes Mellitus y sus complicaciones. En esta situación, los sistemas de defensa antioxidante resultan insuficientes para mantener la homeostasis generando la necesidad de recurrir a terapias farmacológicas. En este sentido, los extractos de plantas poseen numerosos compuestos antioxidantes que pueden servir, al menos, como coadyuvantes en los tratamientos.

En la Argentina se encuentra ampliamente distribuida *Larrea divaricata* Cav. que es un arbusto que posee actividad antioxidante reportada y se sabe que una especie norteamericana relacionada (*Larrea tridentata*) es usada popularmente para tratar la Diabetes. Por lo tanto, se propuso estudiar la composición fitoquímica de un extracto acuoso de *L. divaricata* (ExA), el mecanismo de su acción antioxidante, en diferentes modelos de estrés oxidativo provocado por altos niveles de glucosa, su toxicidad sub-crónica y sus parámetros farmacocinéticos.

La caracterización fitoquímica de ExA se realizó a través de la cuantificación de compuestos polifenólicos, de flavonoides y de sus compuestos mayoritarios por HPLC, de la determinación de los grupos fitoquímicos de mayor presencia en extractos acuosos y de su composición nutricional y mineral. Además, se propuso identificar otros compuestos, polifenólicos, presentes en el extracto. En este sentido, se logró caracterizar a ExA identificando y cuantificando sus compuestos mayoritarios, estableciendo un marcador fitoquímico: NDGA, reportando por primera vez la presencia de compuestos flavonoides: Rutina, Floretina y Epicatequina y determinando su composición nutricional y mineral.

Para analizar la farmacodinamia de ExA, se desarrollaron modelos no biológicos “in vitro” (actividad antioxidante general), modelos biológicos “in vitro” en células del sistema inmune (macrófagos) incubadas con altas concentraciones de glucosa y en órganos como las glándulas submandibulares de ratas con Diabetes inducida por la administración de STZ, y un modelo “in vivo” en ratones con Diabetes inducida. Cabe mencionar que se evaluó la actividad de ExA y de NDGA en paralelo para determinar si dichos efectos se debían a la acción del NDGA (conocido antioxidante), a una sinergia entre este y otros compuestos o a otros compuestos presentes en ExA.

Al analizar la actividad antioxidante general de ExA y NDGA se observó que en, su gran mayoría, dicha actividad se debe a la sinergia entre el NDGA y otros compuestos presentes en el extracto. El NDGA resulto ser el responsable de la modulación de dos enzimas: SOD y CAT y no tuvo participación en la acción reductora de metales de ExA. Cuando se determinó la actividad antioxidante en macrófagos sometidos a altas concentraciones de glucosa se observó que la mayoría de los efectos de ExA se deben a otros compuestos. El NDGA estuvo implicado en la prevención del estrés nitrosativo, pero no sería el único responsable.

En el modelo de glándulas submandibulares de ratas, se observó que ExA logro revertir los efectos oxidativos de la Diabetes inducida por la administración de STZ. Nuevamente, la sinergia entre los compuestos mostró ser la responsable de la mayoría de los efectos observados.

Por otra parte, ExA no presentó toxicidad sub-crónica y su administración por vía oral y/o i.p. no modificó la glucemia ni el peso de los animales. Sin embargo, la administración oral de ExA revirtió el aumento de la glucemia producido por la STZ en ratones.

Por último, se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos con el fin de determinar la estabilidad de ExA en el medio gastrointestinal y sus parámetros farmacocinéticos. En primer lugar, los cambios que sufre el extracto durante el proceso de digestión simulada no afectaron de manera significativa sus actividades antioxidantes.

DISCUSIÓN

En conclusión, ExA fue capaz de modular las EROyN's y los sistemas antioxidantes en distintos modelos siendo más efectivo que su compuesto mayoritario aislado. Además, su actividad antihiper-glucemiante refuerza la potencialidad de ExA como coadyuvante de patologías como la DM.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abiusso N., 1971. Digestibilidad de las jarillas (*Larrea Spp.*) y su posible aprovechamiento en la alimentación del ganado. *Rev. Fac. Agr. La Plata* 47: 37-44.
- Abu-Amsha R., Croft K.D., Puddey I.B., Proudfoot J.M., Beilin L.J., 1996. Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci (Lond)* ;91(4):449-58.
- Adams D.A., 1970. Study of the possibilities of treating creosote bush with $\text{Na}(\text{OH})$ to make a good livestock feed. Master's thesis. Sul Ross State, Univ. Alpine Tex., pp 51.
- Aitken-Saavedra J., Rojas-Alcayaga G., Maturana-Ramírez A., Escobar-Álvarez A., Cortes-Coloma A., Reyes-Rojas M., Viera -Sapiain V., Villablanca-Martínez C., Morales-Bozo I., 2015. Salivary gland dysfunction markers in type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Exp Dent* ; 7(4): e501–e505.
- Akbarzadeh A., Norouzian D., Mehrabi M.R., Jamshidi S.H., Farhangi A., Allah Verdi A., Mofidian S.M.A., Rad B.L., 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 22, 60–64.
- Akerele O., 1993. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum*, 14(4):390-5.
- Alexander B., Browse D.J., Reading S.J., Benjamin I.S., 1999. A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC_{50} . *J Pharmacol Toxicol Methods.* 41(2-3):55-8.
- American Diabetes Association, 2010. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2010 Jan; 33(Suppl 1): S62–S69.
- Anderson, L.C., Shapiro, B.L., 1979. The effect of alloxan diabetes and insulin in vivo on peroxidase activity in the rat submandibular gland. *Arch. Oral Biol.* 24, 343–345.
- Anderson, L.C., Suleiman, A.H., Garret, J.R., 1994. Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland. *Microsc. Res. Tech.* 27,61–70
- Anesini C, Perez C., 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* ;39(2):119-28.
- Anesini C., Boccio J., Cremaschi G., Genaro A., Zubillaga M., Sterin Borda L., Borda E., 1997. In vivo antitumoural activity and acute toxicity study of *Larrea divaricata* Cav. Extract. *Phytotherapy Research*; Vol 11, 7; 521-523.
- Anesini C., Ferraro G., López P., Borda E., 2001. Different intracellular signals coupled to the anti-proliferative action of aqueous extract from *Larrea divaricata* cav and nor-dihydroguaiaretic acid on a lymphoma cell line. *Phytomedicine*, 81(1): 1-7.
- Anesini C., Ferraro G., López P., Borda E., 2001. Different intracellular signals coupled to the anti-proliferative action of aqueous crude extract from *Larrea divaricata* Cav. and nor-dihydroguaiaretic acid on a lymphoma cell line. *Phytomedicine* ;8(1):1-7
- Anesini C., Genaro A., Cremaschi G., Sterin Borda L., Borda E., 1999. Antimitogenic effect of *Larrea divaricata* Cav.: participation in arachidonate metabolism. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* ;122(2):245-52.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anesini C., Genaro A., Cremaschi G., Sterin Borda L., Cazaux C., Borda E., 1996. Immunomodulatory Action of *Larrea divaricata* Cav. *Fitoterapia*, 67:329-333.
- Anesini C., Genaro A., Cremaschi G., Sterin Borda L., Cazaux C., Borda E., 1996. Immunomodulatory activity of *Larrea divaricata*. *Fitoterapia* ; 67: 329–334.
- Anesini C., Turner S., Borda E., Ferraro G., Coussio J., 2004. Effect of *Larrea divaricata* Cav. extract and nordihydroguaiaretic acid upon peroxidase secretion in rat submandibular glands. *Pharmacol Res.*;49(5):441-8.
- Aren G., Sepet E., Özdemir D., Dinççag N., Güvener B., Firatli E., 2003. Periodontal Health, Salivary Status, and Metabolic Control in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. *J Periodontol* ; 74: 1789-95.
- Asfandiyarova N., Kolcheva N., Ryazantsev I., Ryazantsev V., 2007. Risk factors for stroke in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 3, 57–60.
- Babu, P.V.A., Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S., 2006. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem.Biol. Interact.* 162, 114–120.
- Bagheri S., Ahmadvand H., Khosrowbeygi A., Ghazanfari F., Jafari N., Nazem H., Hosseini R.H., 2013. Antioxidant properties and inhibitory effects of *Satureja khozestanica* essential oil on LDL oxidation induced-CuSO₄ in vitro. *Asian Pac J Trop Biomed* ;3(1):22-7
- Bannan, A., Field, J.Z., Zhang, Y., Keshavarzian, A., 2001. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G1234–G1246
- Barrera G., 2012. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol*: 137289.
- Basta G., Schmidt A., De Caterina R., 2004. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research*, Volume 63, Issue 4, 582–592
- Becherel P.A., Chosidow O., LeGoff L., Frances C., Debre P., Mossalayi M.D., Arock M., 1997. Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. *Mol Med* 3: 686-694.
- Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A. and Freeman B. A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 1620-1624
- Bertotto J.C., 1964. *Flora medicinal de todas las regiones del mundo*, 3ra edición. Editorial Arenarial, Buenos Aires, 347 pgs.
- Blois M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, Volume 181, Issue 4617, pp. 1199-1200 (1958)
- Bongiovanni G., Cantero J., Eynard A., Goleniowski M., 2008. Organic extracts of *Larrea divaricata* Cav. induced apoptosis on tumoral MCF7 cells with an higher cytotoxicity than nordihydroguaiaretic acid or paclitaxel. *J Exp Ther Oncol.*;7(1):1-7.
- Bredt D.S., 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31, 577-596.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, E., Lenkiewicz, L., Borchers, M.T., Lusic, A.J., Lee, J.J., Lee, N.A., Abu-Soud, H.M., Ischiropoulos, H., Hazen, S.L., 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* 277, 17415–17427.
- Brownlee M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* ; 414:813–20. 21
- Butterfield D.A., Koppal T., Howard B., Subramaniam R., Hall N., Hensley K., Yatin S., Allen K., Aksenov M., Aksenova M., Carney J., 1998. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N.Y. Acad Sci* 854, 448–462.
- Cabrera A.L., 1968. Flora de la Provincia de Buenos Aires, tomo IV, colección científica del INTA, Buenos Aires, pp 30-35.
- Cabrera A.L., 1976. Regiones fitogeográficas Argentinas. *Enciclo. Agr. de Agr y Jard*, II (1): 1-85.
- Carbonaro M., Grant G., Pusztai A., 2001. Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *European Journal of Nutrition*, 40: 84-90.
- Carlsson J., 1987. Peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J Oral Pathol*, vol.16, pp.412–416.
- Carrillo M.C., Kanai S., Nokubo M., Kitani K., 1991. Derprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci* 1991; 48: 517-521.
- Ceriello A., 2006. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract* 12 (1), 60–62.
- Chan y Lotspeich, 1962
- Cisneros E., Pupo Balboa J., Cespedes E., 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: glutatión peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed*; 16(1):10-15
- Comision Europea DGXI, 1996. Recomendaciones para la Eutanasia de los animales de Experimentacion: Parte 1 y 2.
- Corrales L. y Munoz Ariza M., 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias biomédicas Vol 10 n 1*.
- Coskun O., Kanter M., Korkmaz A., Oter S., 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*, 51(2):117-23.
- Crespy y col., 2001
- Cutler, L., Pinney, H., Christian, C., Russotto, S., 1979. Ultrastructural studies of rat submandibular glands in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Virchows Arch.* 382, 301–311.
- Das T.K., Mani V., Kaur H., Kewalramani N., De S., Hossain A., Banerjee D., Datta B.K., 2012. Effect of vitamin E supplementation on arsenic induced oxidative stress in goats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 89(1):61-6.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Davicino R., Alonso R., Anesini C., 2010. Composiciones topicas para el crecimiento del cabello CONICET- 12/05/2009 P 090101704. Boletín de Patentes, julio 2010, 44. Resolución Nro AR071713B1(15/12/2017)
- Davicino R., Alonso R., Anesini C., 2011. "In vivo" and "in vitro" activity of *Larrea divaricata* Cav. on EL-4 cells. *Hum Exp Toxicol*; 30: 965-971.
- Davicino R., Genaro A.M., Cremaschi G., Anesini C., 2011. Leukotrienes antagonize the antiproliferative effect of *Larrea divaricata* Cav. on a lymphoma cell line interfering with cAMP intracellular level and PKC activity. *Cancer Invest.*;29(1):29-36.
- Davicino R., Manuele M.G., Turner S., Ferraro G., Anesini C., 2010. Antiproliferative activity of *Larrea divaricata* Cav. on lymphoma cell line: Participation of Hydrogen Peroxide in its action. *Cancer Investigation*; 28: 13–22.
- Davicino R., Mattar A., Casali Y., 2006. Activation and apoptosis of mouse peritoneal macrophages by extracts of *Larrea divaricata* Cav. (jarilla). *International Immunopharmacology* 6 (13-14): 2047–2056.
- Davicino R., Mattar A., Casali Y., 2007. In vivo immunomodulatory effects of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav.. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 29 (3-4): 351 – 366.
- Davicino R., Mattar M., Casali Y., Correa S., Pettenati E., Micalizzi B., 2007. Actividad antifungica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev peru biol* 14(2): 247-251.
- Davicino R., Peralta I., Martino R., Alonso R., Anesini C., 2015. Preventive Anti-Inflammatory Activity of an Aqueous Extract of *Larrea Divaricata* Cav. And Digestive and Hematological Toxicity. *Int J Pharm Sci Res*; 6(8): 3215-23.
- Davicino, R., Manuele, M.G., Ferraro, G., Micalizzi, B., Anesini, C., 2009. Modulatory effect of hydrogen peroxide on tumoral lymphocytes proliferation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31, 130–139
- De Coursey T.E. y Ligeti E., 2005. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci.*, 62(19-20):2173-93
- Del Vitto L.A., Petenatti E.M., 1997. Herbal resource of San Luis (Argentina) First part: native plants. *Multequina*.6: 49–66
- Dessein A.J., Vadas M.A., Nicola N.A., Metcalf D., David J.R., 1982. Enhancement of human blood eosinophil cytotoxicity by semi-purified eosinophil colony-stimulating factor(s). *J. expo Med*; 156; 90
- DHEW Publication No. (NIH) 80-23, Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD 20205.
- Dimmeler S., Lottspeich F. and Brune B., 1992. Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biol Chem* 267, 16771-16774
- Dodge N., 1968. The desert wildflowers. SW Monuments Assoc. Phoenix, Arizona, pp 67.
- Dorado Lambert A. y Revilla Montero J., 2000. Radicales libres de oxígeno y distress respiratorio agudo. *Rev Cubana Pediatr* v.72 n.3 Ciudad de la Habana
- Dröge W., 2002. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol*; 37(12):1333-45.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dröge W., 2011. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47–95.
- Ekor M., 2013. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*; 4: 177.
- Elmali E., Altan N., Bukan N., 2004 Effect of the Sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozocin-induced diabetic rats. *Drugs R D* ;5(4):203–8.
- Erejuwa O.O., 2012. Oxidative stress in diabetes mellitus: is there a role for hypoglycemic drugs and/or antioxidants. *Oxid. Stress Dis.*, 217–246.
- Fang Yun-Zhong, Yang Sheng, Wu Guoyao, 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879.
- Farmacopea Argentina 7ma Ed., 2003. Decreto N° 202. Buenos Aires, República Argentina
- Feelisch M., Ostrowski J. and Noack E., 1989. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14, S13±S22
- Feelisch M., 1991. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J Card Pharm* 17, 25±S33
- Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L., 2007. Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushroom from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food. Chem* 100, 1511-1516.
- Filip R., Ferraro G., 2003. Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*. *Phytochemical and pharmacology study Eur J Nutr* 42: 50–54
- Floriano-Sanchez E., Villanueva C., Medina-Campos O.N., Rocha D., Sanchez-Gonzalez D.J., Cardenas-Rodriguez N., Pedraza-Chaverri J., 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Res* 40(5): 523-533
- Fonseca S.G., Romão P.R., Figueiredo F., Morais R.H., Lima H.C., Ferreira S.H., Cunha F.Q., 2003. TNF- α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous Leishmaniasis. *Eur J Immunol*; 33(8):2297-306.
- Freidovich I., 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what’s the matter with oxygen? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 893, 13.
- García-Alcover B., 1950. *Medicina herbaria chilena*. México. La vida naturista. pp 351.
- Gaté L., Paul J., Ba G.N., Tew K.D., Tapiero H., 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 53(4):169-80.
- Geiszt M., Witta J., Bay J., Lekström K., Leto T.L., 2003. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*, vol 17, pp 1502–1504.
- Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G., 1995. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 44 (3), 363–368.
- Goodman & Gilman’s, 2012. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*- 12th Ed. (2012)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Goodman Y., Steiner M.R., Steiner S.M., Mattson M.P., 2001. Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res* ;654:171–6.
- Gugliucci A. y Menini T., 2002 The botanical extracts of *Achyrocline satureioides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sci.* 72(3):279-92.
- Gugliucci A. y Stahl A.J., 1995. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int.* 35(1):47-56.
- Gugliucci A., 1996. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.*;224(2):338-44.
- Gugliucci A., Bastos D., Schulze J., Souza M., 2009. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia*, Vol 80, Issue 6, 339-344, Elsevier.
- Gugliucci A., Menini T., 2015. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta.*;439:5-13.
- Gulcin I., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3):213-20.
- Gutiérrez-Salinas J., Mondragón-Terán P., García-Ortíz L., Hernández-Rodríguez S., Ramírez-García S., Núñez-Ramos N., 2014. Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Méd Quir*;19:446-454.
- Gutteridge J., Mitchell J., 1999. Redox imbalance in the critically ill. *British Medical Bulletin*, Volume 55, Issue 1, Pages 49–75.
- Habermehl G., Christ B., 1974. Free steroids in *Larrea divaricata*. *Phytochemistry*. 13 (7): 1293-1294.
- Halliwell B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721–724.
- Halliwell B., Gutteridge J., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed., Univ. PressNY: Oxford.
- Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E., 1992. Free radicals. Antioxidants and human disease: Where are we now. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119: 598-620
- Halliwell B., Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–85.
- Hanneken A., Lin F.F., Johnson J., Maher P., 2006. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 47(7):3164-77
- Hänström L., Johansson A., Carlsson J., 1983. Lactoperoxidase and thiocyanate protect cultured mammalian cells against hydrogen peroxide toxicity. *Med. Biol.* 61, 268–274.
- He R.R., Li Y., Li X.D., Yi R.N., Wang X.Y., Tsoi B., Lee K.K., Abe K., Yang X., Kurihara H., 2013. A new oxidative stress model, 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride induces cardiovascular damages in chicken embryo. *PLoS One.* 2013;8(3).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hermo R., Mier C., Mazzota M., Tsuji M., Kimura S., Gugliucci A., 2005. Circulating level of nitrate apolipoprotein A-1 are increased in type 2 diabetic patients. *Clin Chem Lab Med*, 2005; 43(6):601-606.
- Herzog V., Fahimi H.D., 1973. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3-diaminobenzidine as hydrogen donors. *Anal Biochem*. 55: 554–562
- Hieronymus J., 1882. *Plantae diaphoriacea florum Argentinae*. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias (Córdoba) 4: 199.
- Hilaly J.E., Israili Z.H., Lyoussi B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *J Ethnopharm* ; 91: 43–50.
- Hodges R.R., Dicker D.M., Rose P.E., Dartt D.A., 1992. Alpha 1 adrenergic and cholinergic agonist use separate signal transduction pathway in lacrimal gland. *Am. J. Physiol*. 262, G1087-G1096.
- Hofmanova J., Soucek K., Pachernik J., Kovarikova M., Hoferova Z., Minksova K., 2002. Lipoxygenase inhibitors induce arrest of tumor cells in S-phase of the cell cycle. *Neoplasma* ;49:362–7.
- Holm P., Kankaanranta H., Metsa-Ketela T. and Moilanen E., 1998. Radical releasing properties of nitric oxide donors GEA 3162, SIN-1 and S-nitroso-N-acetylpenicillamine. *Eur. J. Pharmacol*. 346, 97±102.
- Huang D., Jiang Y., Chen W., Yao F., Huang G., Sun L., 2015. Evaluation of hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*. *J Ethnopharmacol*.163:256-63.
- Huang J.K., Chen W.C., Huang C.J., Hsu S.S., Chen J.S., Cheng H.H., 2004. Nordihydroguaiaretic acid-induced Ca²⁺ handling and cytotoxicity in human prostate cancer cells. *Life Sci* ;75:2341–51.
- Hunt J.V., Dean R.T., Wolff S.P., 1988. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. *Biochem. J*. 256, 205–212.
- Hunziker J., Palacios R. 1969. Hibridación natural en especies sudamericanas de *Larrea* (Zygophyllaceae). *Kurtziana* 5: 55-66.
- Hye-Lin Ha, Hye-Jun Shin, Feitelson M.A., Dae-Yeul Yu, 2010. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J Gastroenterol*; 16(48): 6035–6043.
- Ibuki, F.K., Simões, A., Nogueira, F.N., 2010. Antioxidant enzymatic defense in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats: a temporal study. *Cell Biochem. Funct*. 28, 503–508.
- Idris I., Donnelly R., 2009. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: an emerging new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes Obes Metab.*;11(2):79-88.
- Iñarrea P., Moini H., Rettori D., Han D., Martinez J., Garcia I., Fernandez-Vizcarra E., Iturralde M., Cadenas E., 2005. Redox activation of mitochondrial intermembrane space Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochemical Journal*;387: 203–209
- Jian Luo, Chuang T., Cheung J., Quan J., Tsai J., Sullivan C., Hector R., Reed M., Meszaros K., King S., Carlson T., Reaven G., 1998. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush *Larrea tridentata*. *European Journal of Pharmacology* 346. 77–79
- Johansen Schultz J., Harris A., Rychly D., Ergul A., 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes. *Cardiovas Diabetol* 4, 5.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Karakaya S., 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 44(6):453-64.
- Kennedy G.L., Ferenz R.L., Burgess B.A., 1986. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. *J Appl Toxicol*; 6: 145-148.
- Klotz L., Sánchez-Ramos C., Prieto-Arroyo I., Pavel U., Steinbrenner H., Monsalve M., 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.*; 6: 51-72.
- Kobayashi Y., Suzuki M., Satsu H., Arai S., Hara Y., Suzuki K., Miyamoto Y., Shimizu M., 2000. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *Agric Food Chem.* 48(11):5618-23.
- Komabayashi T., Ikeda T., Suda K., Izawa T., 2000. Beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase activity in parotid acinar cells from acute streptozotocin induced diabetic rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107(3-4):311-22.
- Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y., Shibata H., 1997. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta* ;1335(3):335-42.
- Kuhn M. y Winston D., 2008. *Herbal Therapy and Supplements*. New York, Lippincott Williams & Wilkins.
- Kuppusamy U.R., Indran M., Balraj B.R.S., 2002. Antioxidant effects of local fruits and vegetable extracts. *Journal of Tropical Medicinal Plants*, 3(1), 47-53.
- Lambert J.D., Zhao D., Meyers R.O., Kuester R.K., Timmermann B.N., Dorr R.T., 2002. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol*; 40(12):1701-8.
- Larkins N., Wynn S., 2004. *Pharmacognosy: Phytomedicines and their mechanisms*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* ;34(1): 291-327.
- Lattimer J.M. y Haub M., 2010. Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health Nutrients. 2010 Dec; 2(12): 1266-1289.
- Lee H.B., Yu M.R., Yang Y., Jiang Z., Ha H., 2003. Reactive oxygen species regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*; 14 (8 Suppl. 3):S241-5
- Lena M.L., Barlow P., 2004. Flavonoid recovery and stability from Ginkgo biloba subjected to a simulated digestion process. *Food Chemistry* 86; 195-202
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* vol 186, pp 464-78.
- Lin C.C., Hsu Y.F., Lin T.C., 2001. Antioxidant scavenging effects of tannins of *Terminalia Catapa* L. *Anticancer Research*, 21(1A) 237-243.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*193(1):265-75.
- Luo J., Chuang T., Cheung J., Quan J., Tsai J., Sullivan C., Hector R.F., Reed M.J., Meszaros K., King S.R., Carlson T.J., Reaven G.M., 1998. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Eur J Pharmacol.* 346(1):77-9.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mabry T.J., Difeo D.R., Sakakibara M., 1977. The natural products: chemistry of Larrea. In T.J. Mabry, J.H. Hunziker, D.R. Difeo, eds. *Creosote Bush Biology and Chemistry of Larrea in New World Desserts*, HutchinSon & Ross Inc., Dowden, Stroudsburg.
- MacRae F., Yancey P., Davies S., Gray W., Linton E., Vickers K., 2015. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. *Endotext* .
- Maestri D.M., Nepote V., Lamarque A.L., Zygadlo J.A., 2006. Natural products as antioxidants Phytochemistry: *Advances in Research*: 105-135
- Mammen D., Daniel M., 2012. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem.* 135(3):1365-8.
- Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17 (1),24–38.
- Martino R., Barreiro Arcos M.L., Alonso R., Sülsen V., Cremaschi G., Anesini C., 2016. Polyphenol rich fraction from Larrea divaricata and its main flavonoid quercetin-3-methyl ether induce apoptosis in lymphoma cells through nitrosative stress. *Phytother Res.* 2016 Jul; 30 (7):1128-36.
- Martino R., Canale F., Sülsen V., Alonso R., Davicino R., Mattar A., Anesini C., Micalizzi B., 2014. A fraction containing kaempferol-3,4'-dimethylether from Larrea divaricata Cav. induces macrophages activation on Candida albicans infected mice. *Phytotherapy Research* 28: 917-924.
- Martino R.F., Davicino R.C., Mattar M.A., Casali Y.A., Correa S.G., Anesini C., Micalizzi B., 2010. In vitro immunomodulatory effects of fractions obtained from aqueous extracts of Larrea divaricata Cav (Jarilla) on mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 32(1):125-32.
- Martino R.F., Davicino R.C., Mattar M.A., Casali Y.A., Correa S.G., Micalizzi B., 2011. In vivo effect of three fractions of Larrea divaricata Cav. (jarilla) on the innate immune system: macrophage response against Candida albicans. *Mycoses*; 54(6):e718-25.
- Mata A.D., Marques D., Rocha S., Francisco H., Santos C., Mesquita M.F., Singh J., 2004. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem* ;261(1-2):137-42.
- Matés, J.M., 2001. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactiveoxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83–104.
- Mattei R., Paz Barros M., Galvão S.M., Bechara E.J., de Araujo Carlini E.L., 2001. Heteropteris aphrodisiaca O. Machado: effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytother Res*; 15(7):604-7
- Mendes M. y Bogle D., 2015. Evaluation of the Effects and Mechanisms of Bioactive Components Present in Hypoglycemic Plants. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* Vol. 1, No. 3, 2015, pp. 167-178
- Menini T., Heck C., Schulze J., de Mejia E., Gugliucci A., 2007. Protective action of Ilex paraguariensis extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. *Planta Med* ;73(11):1141-7.
- Micucci P., Alonso M. R., Turner S., Davicino R., Anesini C., 2011. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Larrea Divaricata Cav. Aqueous Extract on Vitamin C from Natural Orange Juice. *Food and Nutrition Sciences* 2(01):35-46.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ministerio de Salud de la República Argentina, 2012. Guía práctica clínica nacional sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la Diabetes Mellitus.

Mohan H., 2002. Textbook of Pathology, fourth ed. Jaypee publishers.

Moldogazieva N.T., Lutsenko S.V., Terentiev A.A., 2018. Reactive Oxygen and Nitrogen Species-Induced Protein Modifications: Implication in Carcinogenesis and Anticancer Therapy. *Cancer Res* ;78(21):6040-6047.

Morel Y. y Baroukii R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*; 342: 481-496.

Moron M.A., Depierre J.W., Mannervick B., 1979. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochim. Biophys Acta*. 582: 67-78.

Moussa S.A., 2008. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian J. Biophys.* 18 (3), 225-236.

Murillo A., 1889. *PZantes Medicinales du Chiii*, Paris.

Murrah V.A., 1985. Diabetes mellitus and associated oral manifestations: a review. *J. Oral Pathol.* 14, 271-281

Naderi R., Mohaddes G., Mohammadi M., Alihemmati A., Badalzadeh R., Ghaznavi R., Ghyasi R., Mohammadi Sh., 2015. Preventive effects of garlic (*Allium sativum*) on oxidative stress and histopathology of cardiac tissue in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Physiol Hun* ;102(4):380-90.

Nasri H. y Rafieian-Kopaei M., 2013. Tubular kidney protection by antioxidants. *Iran J Public Health* ;42:1194-6.

Nasri H., Hedayatollah S., Azar B., Rafieian-kopaei M., 2015. Antioxidant plants and diabetes mellitus. *J Res Med Sci* ; 20(5): 491-502.

National Research Council (US), 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research. Washington (DC): National Academies Press (US).

Nelson D.P., Kiesow L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal. Biochem* vol 49, pp 474-478.

Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB J.*; 13: 9-22

Nguyen T., Brunson D., Crespi C. L., Penman B. W., Wishnok J. S. and Tannenbaum S. R., 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3030-3034

Nimse S. and Pal D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanism. *RSC Advances*. Issue 35.

Nirmalya R., Kingshuk B., Sandip B., 2015. Effect of Black Tea on Diabetes and Metabolic Syndrome May 2015 Project: Phytopharmacological Characterization of Tea. *The Indian journal of nutrition and dietetics* 53.3.5341

Oda D., Nguyen M.P., Royack G.A., Tong D.C., 2001. Oxidative damage in cultured oral epithelial cells: the effect of short-term vitamin C exposure. *Anticancer Re.* 21(4 A): 2719-2724.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OECD [Organization for Economic Co-operation and Development]: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 407 Acute Chemicals. Guideline 407 Repeated Dose 28-Days Oral Toxicity Study in Rodents. Paris: OECD 2008

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 95: 351-358.

Olson H., Betton G., Robinson D., Thomas K., Monro A., Kolaja G., Lilly P., Sanders J., Sipes G., Bracken W., Dorato M., Deun K., Smith P., Berge B., Heller A., 2000. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*; 32: 56–67.

Osawa T. y Namiki M., 1981. A Novel Type of Antioxidant Isolated from Leaf Wax of Eucalyptus leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45:3, 735-739.

Ouslimani N., Peynet J., Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Legrand A., Beaudoux J.L., 2005. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* ; 54:829–34.

Palacio L., Cantero J.J., Cusido R.M., Goleniowski M.E., 2012. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Sci*, 193-194:1-7.

Paracatu L.C., de Faria C.M., Zeraik M.L., Quinello C., Rennó C., Palmeira P., da Fonseca L.M., Ximenes V.F., 2015. Hydrophobicity and antioxidant activity acting together for the beneficial health properties of nordihydroguaiaretic acid. *Food Funct*; 6(6):1818-31.

Parekh A.B. y Penner R., 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.*; 77(4):901-30. Review.

Pedernera A.M., Calderón T.G., Rotelli A.E., De la Rocha N.E., Genaro S.D., Pelzer L.E., 2006. Anti-Ulcerogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Methanolic Extract of *Larrea divaricata* Cav. in Rat. *Journal of Ethnopharmacology*; 105 (3): 415-420.

Peng Wong S., Peng Leong L., Hoe J., Koh W., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry Volume 99, Issue 4, Pages 775-783*

Peralta I., Martino R., Davicino R., Gorzalczany S., Alonso R., Anesini C., 2015. Systemic and local toxicity assay of an aqueous extract of *Larrea Divaricata* Cav.: Role of NDGA. *IJPSR*, Vol. 6, Issue 7

Peralta I., Martino R., Zettler G., Alonso R., Filip R., Anesini C., 2013. Modulator Activity of an Aqueous Extract from *L. divaricata* Cav. on Basal Oxidative and Anti-oxidative Parameters of Normal Rat Submandibulary Glands. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*. 2051-4263.

Percario F., 1991. Radicais libremedicinaintensiva. *Rev Bras Terap Intens*; 3(3): 66 – 72.

Pereira F.D., Cazarolli L., Lavado C., Mengatto V., Santos Reis M., Figueiredo B., Guedes A., Barreto Silva F., 2011. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*. Volume 27, Issues 11–12, Pages 1161-1167.

Perez C. y Anesini C., 1994. In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *J Ethnopharmacol* 44(1): 41-6.

Perfumi M., Arnold N., Tacconi R., 1991. Hypoglycemic activity of *Salvia fruticosa* Mill. *J.Ethnopharmacol*. 1991;23:135–40.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Perron N. and Brumaghim J., 2009. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys* 53:75–100
- Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *IJBS* 4 (2), 89–96.
- Phillips M., Cataneo R.N., Cheema T., Greenberg J., 2004. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 344 (1-2), 189–194.
- Polo de Santos M., 2016. Estudio de la actividad antioxidante de las aguas mineromedicinales (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.
- Prosky L., Asp N.G., Schweizer T.F., DeVries J.W., Furda I., 1988. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem.*;71(5):1017-23.
- Pruitt K.M., Mansson-Rahemtulla B., Tenovuo J., 1983. Detection of the hypothiocyanite (OSCN⁻) ion in human parotid saliva and the effect of pH on OSCN⁻-generation in the salivary peroxidase antimicrobial system. *Arch Oral Biol*, vol 28, pp 517–525.
- Quattrocchi O., Abelaira S., Laba R., 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro. Ed 1. Buenos Aires, Argentina.
- Rafieian-Kopaie M. y Nasri H., 2012. Silymarin and diabetic nephropathy. *J Renal Inj Prev* ;1:3–5.
- Ragonesse E., Milano V., 1984. Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería, 2da edición, II, 8(2). Editorial Acme, S.A.C.I. Buenos Aires.
- Ratera E. & Ratera M.O., 1980. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Buenos Aires. Ed. Hemisferio Sur. 189 p
- Reed M.J., Meszaros K., Entes L.J., Claypool M.D., Pinkett J.G., Brignetti D., Luo J., Khandwala A., 1999. Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* 42: 102±106.
- Reznick A.Z., Shedadeh N., Shafir Y., Nagler R M., 2006. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with type 1 diabetes Mellitus. *Arch Oral Biol* 51(8): 640-648.
- Rivero-Cruz I., Acevedo L., Guerrero J., Martínez S., Bye R., Pereda-Miranda R., Franzblau S., Timmermann B., Mata R., 2005. Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J Pharm and Pharmacol*. 57: 1117–1126.
- Rodríguez-Mañas L., Angulo J., Vallejo S., 2003. Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia*; 46:556–66
- Ross I., 2005. Medicinal Plants of the World, Volume 3. Chemical constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Rubinstein R., Genaro A.M., Motta A., Cremaschi G., Wald M.R., 2008. Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose. *Clin Exp Immunol* ;154(2):235-46.
- Ruzaidi A., Amin I., Nawalyah A.G., Hamid M., Faizul H.A., 2005. The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*. 98,55–60

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rytomaa, T., 1960. Organ distribution and histochemical properties of eosinophil granulocytes in the rat. *Acta Path Microbiol Scan*; 50: 1-118.
- Sabu M.C., Smitha K., Ramadasan K., 2002. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 83, Issues 1–2, Pages 109-116
- Sakakibara M., Difeo D., Nakatani N., Timmermann B., Mabry T., 1976. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. *Phytochemistry*. 15: 727-731.
- Salvador Escorcía, 2009. Artículo de revisión Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 17, No. 3 pp 120-128.
- Sanchez Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Schapira A.H., 1995. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.*; 21(1):3-9
- Schopf R.E., Mattar J., Meyenburg W., Scheiner O., Hammann K.P., Lemmei E.M., 1984. Measurement of the respiratory burst in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence. *J Immunol Methods* 67: 109-117.
- Sekhar R.V., McKay S., Patel S., Guthikonda A., Reddy V., Balasubramanyam A. and Jahoor F., 2011. Glutathione Synthesis Is Diminished in Patients With Uncontrolled Diabetes and Restored by Dietary Supplementation With Cysteine and Glycine. *Diabetes Care*; 34(1): 162–167.
- Sen S., Chakraborty R., Sridhar C., Reddy Y. S. R., Biplab De, 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res* 3 (1), 91–100.
- Seufferlein T., Seckl M.J., Schwarz E., Beil M., WichertvG., Baust H., 2002. Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells. *Br J Cancer*; 86:1188–96.
- Shaik A.H., Shaik N.R., Mohammed A.K., Al Omar S.Y., Mohammad A., Mohaya T.A., Kodidhela L.D., 2017. *Terminalia pallida* fruit ethanolic extract ameliorates lipids, lipoproteins, lipid metabolism marker enzymes and paraoxonase in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Saudi J Biol Sci* ;25(3):431-436.
- Sheybani Asl Z., Akbar Malekirad A., AbdollahiM., 2014. Effects of the Mixture of *Cichorium intybus* L. and *Cinnamomum zeylanicum* on Hepatic Enzymes Activity and Biochemical Parameters in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Health* 6(11):1212-1217.
- Shimizu M., Kobayashi Y., Suzuki M., Satsu H., Miyamoto Y., 2000. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem*, 48, pp. 5618-5623
- Shishido Y., Furushiro M., Hashimoto S., Yokokura T., 2001. Effect of nordihydroguaiaretic acid on behavioral impairment and neuronal cell death after forebrain ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*; 69:469–74.
- Singh N., Kamath V., Rajini P.S., 2005. Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameters in STZ-induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. *Clin. Chim. Acta* 353, 165–175.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Konorev E. and Kalyanaraman B., 1999. The peroxyxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Arch Biochem Biophys*, 361, 331±339.
- Smart C.R., Hogle H.H., Robins R.K., Broomm A.D., Bartholomew D., 1968. An interesting observation on nordihydroguayaretic acid (NSC 4291, NDGA) and a preliminary report. *Cancer Chemotherapy Reports part 1* 53 (2): 147-151.
- Soko R.J., McKim J.M., Deveraux M.W., 1996. α -tocopherol ameliorates oxidant injury in isolated copper-overload rat hepatocytes. *Pediatr. Res.* 39, 259–263.
- Soraru B., Bandoni A., 1978. *Plantas de la medicina popular Argentina*. editorial Albatroz, Buenos Aires, 153.
- Stege P., Davicino R., Vega A., Casali Y., Correa S., Micalizzi B., 2006. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav. (jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine*; 13: 724-727.
- Storz P., 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*; 10:1881-96.
- Sun Y. y Oberley L.W., 1996. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med.*; 21(3):335-48.
- Suzuki Y., Ono Y. and Hirabayashi Y., 1998. Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 425: 209- 212.
- Swaran J.S., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* ; 2(4): 191–206.
- Tabas I., Bornfeldt K.E., 2016. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res* ;118(4):653-67.
- Takahama U., Hirota S., Nishioka T., Oniki T., 2003. Human salivary peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite and nitration of salivary components 4-hydroxyphenylacetic acid and proteins. *Arch Oral Biol*; 48: 679–690.
- Tenovuo, J., Larjava, H., 1984. The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assessed by the uptake of 3H-thymidine by human gingival fibroblasts cultured in vitro. *Arch. Oral Biol.* 29, 445–451.
- Tessier D., Khalil A., Fülöp T., 1999. Effects of an oral glucose challenge on free radicals/antioxidants balance in an older population with type II diabetes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* ; 54:M541–5
- Thannickal V.J. y Fanburg B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 279(6):L1005-28.
- Thorn G.W., Forsham P.H., Frawley T.F., Hill S.R., Roche M., Staehelm D., Wilson D.L., 1950. The clinical usefulness of ACTH and cortisone. *N Engl J Med*; 242: 783-793.
- Timmerman B., Valesi A., Mabry T., 1979. Flavonoids from *Larrea nitida*, *divaricata* and *cuneifolia*. *Revista Latinoamericana de Química* 10: 81-83.
- Turner S., Davicino R., Alonso R., Ferraro G., Filip R., Anesini C., 2011. Potential use of low-NDGA *Larrea divaricata* extracts as antioxidant in foods *Gra Rev. peru. biol.* 18(2): 159 - 164

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Turner S., Davicino R., Ferraro G., Filip R., Anesini C., 2007. Comparative Study of the Antioxidant Activity of an Aqueous Extract of *Larrea divaricata* Cav and NDGA. SILAE, XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina.
- Turner S., Zettler G., Arcos M.L., Cremaschi G., Davicino R., Anesini C., 2012. Effect of streptozotocin on reactive oxygen species and antioxidant enzyme secretion in rat submandibular glands: a direct and an indirect relationship between enzyme activation and expression. *Eur J Pharmacol.*; 659(2-3):281-8.
- Turner S., Zettler G., Barreiro Arcos M.L., Cremaschi G., Davicino R., Anesini C., 2001. Effect of streptozotocin on reactive oxygen species and antioxidant enzymes` secretion in rat submandibular glands: a direct and an indirect relationship between enzyme activation and expression. *Eur J Pharmacol.*; 659:281-288.
- Varsha G., Uma Maheswari B., Ramasamy M., Karunanithi M., 2016. Effect of the ethanolic extract of *Calophyllum inophyllum* leaves on oxidative stress complications in mouse model. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 9, Issue 3, 250-252.
- Verettoni N., 1985. Contribución al conocimiento de las plantas medicinales de la región de Bahía Blanca, Bs As.
- Vincent A.M., Russell J.W., Low P., Feldman E.L., 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews* ; 25:612–28.
- Vogt V., Cifuentes D., Tonn C., Sabini L., Rosas S., 2013. Antifungal activity in vitro and in vivo of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. *Ind Crops and Prod.* 42: 583-586.
- Wallace J.I., 2004. Management of diabetes in elderly. *Clin. Diabetes* 17, 1.
- Wang H.C. and Brumaghim J., 2011. Polyphenol Compounds as Antioxidants for Disease Prevention: Reactive Oxygen Species Scavenging, Enzyme Regulation, and Metal Chelation Mechanisms in *E. coli* and Human Cells Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy. American Chemical Society, Chapter 5, pp 99–175.
- Wang, N., Nair M.G., Strasburg G.M., Booren A.M., Gray J.L., 1999. Novel antioxidant compounds from tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Natural Products*; 62: 86-88.
- Weiss R.B., 1982. Streptozotocin: A review of its pharmacology, efficacy and toxicity. *Cancer Treat Rep*;66: 427-438.
- Weller P.F., Lee C.W., Foster D.W., Corey E, Austen K.F., Lewis R.A., 1984. Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4. *Proc Nat Acad Sci (Wash.)*, 80: 7626.
- West M., Mhatre M., Ceballos A., Floyd R.A., Grammas P., Gabbita S.P., Hamdheydari L., Mai T., Mou S., Pye Q.N., Stewart C., West S., Williamson K.S., Zemlan F., Hensley K., 2004. The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice. *JNeurochem*;91(1):133-43.
- West, I.C., 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med.* 17, 171–180

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Williamson J.R., Chang K., Frangos M., Hasan K.S., Ido Y., Kawanura T., Nyengoard J.R., Van den Edden M., Kilo C., Tilton R.G., 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42, 801–803.
- Winkelman M., 1989. Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. *Med. Anthropol.*, 11, pp. 255–268
- Wolff, S.P., Dean, R.T., 1987. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.* 245, 243–250
- Wu K.K., Huan Y., 2008. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*; Chapter 5:Unit 5.47.
- Wu L.Y., Juan C.C., Hwang L.S., Hsu Y.P., Ho P.H., Ho L.T., 2004. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Eur J Nutr.* 43(2):116-24.
- Xiang D., Wang C., Wang W., Shi C., Xiong W., Wang M., 2017. Gastrointestinal stability of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin: an in vitro investigation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* Vol 68, Pages 704-711
- Yam-Canul P., Chirino Y.I., Sánchez-González D.J., Martínez-Martínez C.M., Cruz C., Villanueva C., Pedraza-Chaverri J., 2008. Nordihydroguaiaretic acid attenuates potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol*; 46(3):1089-96.
- Yazdanparast R., Ardestani A., Jamshidi S., 2007. Experimental diabetes treated with *Achillea santolina*: effect on pancreatic oxidative parameters. *J Ethnopharmacol*; 112(1):13-8.