



Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Efecto de flavonoides frente al estrés oxidativo inducido por antibióticos

Farm. Pamela Soledad Bustos

Departamento de Farmacia – Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Argentina

2017

COMISIÓN DE TESIS

DIRECTORA

Dra. María Gabriela Ortega

COMISIÓN ASESORA

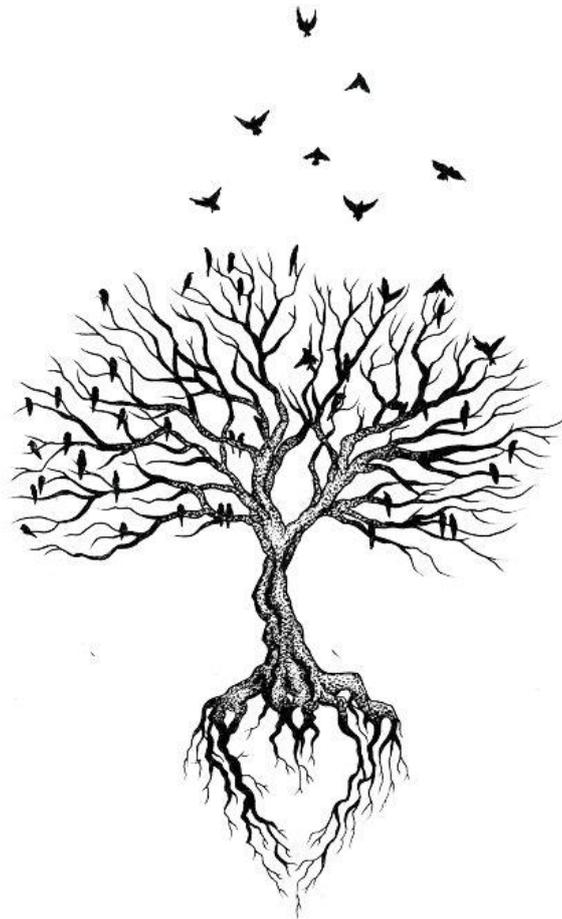
Dra. María del Pilar Aoki

Dra. Paulina Laura Páez

Dr. José Luis Barra

EVALUADORA EXTERNA

Dra. Adriana María Broussalis
(Universidad de Buenos Aires)



A mis Padres: **Lila y David**

A la memoria de mis abuelos: **Aurora, José, Amelia y Fabián**

Raíces y Pilares de mi Vida.

Agradecimientos

“A veces, nuestra propia luz se apaga y se vuelve a encender por la chispa de otra persona. Cada uno de nosotros tiene motivos para pensar con profunda gratitud de aquellos que han encendido la llama dentro de nosotros” Albert Schweitzer

En el punto culminante de mi tesis doctoral y mirando en retrospectiva los años pasados no puedo más que expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra colaboraron en este proceso.

A mi directora de tesis, Gaby Ortega, por abrirme las puertas del laboratorio e invitarme a trabajar con ella. Por darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis doctoral. Por su orientación constante, por la paciencia, por guiar mis pasos pero al mismo tiempo darme la libertad de forjar mi propio camino. Por el apoyo que me brindó tanto en lo laboral como en lo personal durante todos estos años.

A los profesores miembros de mi comisión de tesis Dra. Pilar Aoki y Dr. José Luis Barra, por su seguimiento durante el desarrollo de esta tesis, por sus sugerencias y exigencias que permitieron tanto el enriquecimiento de este trabajo como mi propio crecimiento laboral. A la Dra. Inés Albesa, co-directora inicial de mi tesis, por acompañarme los primeros años transmitiéndome su conocimiento y brindándome sus opiniones y consejos. A la Dra. Paulina Páez por aceptar integrarse a mi comisión de tesis en la etapa culminante, por sus aportes y correcciones.

A la Dra. Adriana María Broussalis por haber accedido a ser evaluadora externa, por sus opiniones, comentarios y correcciones.

A las entidades que han colaborado y brindado el soporte económico para el desarrollo de esta tesis doctoral: SeCyT, CONICET y FONCyT por las becas doctorales y subsidios que permitieron iniciar y concluir este trabajo.

A todos los integrantes del Departamento de Farmacia por compartir el día a día y porque de alguna forma u otra me han ayudado y han colaborado conmigo durante estos años de trabajo. Mil Gracias.

Al grupo de Higiene y Micro por permitirme trabajar en su laboratorio, por hacerme sentir parte, por sus charlas y consejos, por estar siempre predispuestas a darme una mano cada vez que lo necesité. Ceci, Vir, Diame, Sol, Meli y Vivi, gracias por todo. A Pauli mi más sincero agradecimiento por toda la paciencia que me tuviste estos años que te volví loca, por enseñarme todas las técnicas, por mostrarme otros puntos de vista, por apoyarme y ayudarme siempre, por darme una mano y un consejo cuando más lo necesite, Gracias.

A la Dra. Miriam Virgolini y su equipo de trabajo, Romi y Paula, por su colaboración y predisposición para la realización de los ensayos *in vivo*. Romi gracias por toda la onda que le pusiste a las semanas de corridas e intercambios de tubos “en el lugar de siempre”.

A la Dra. Elsa Fuentes de la Facultad de Agronomía de la UNC por realizar tan amablemente la identificación de las muestras de *Prosopis nigra*.

A la Dra. Claudia Albrecht, Pola, gracias por ser mi primera guía en el manejo de bacterias.

Al Departamento de Bioquímica Clínica por permitirme utilizar constantemente su equipo de fluorometría, el cual me permitió continuar con los ensayos de producción de ERO.

Trabajar de lo que a uno le apasiona es un privilegio, pero trabajar con amigos como ustedes es un placer. Por todo el apoyo recibido dentro y fuera del lab a mis amigos y familia, Gracias.

Al “Green Team” porque no podría sentirme más afortunada de pertenecer a este hermoso grupo de personas que siempre saben buscarle la vuelta para ir todos juntos para adelante. Gracias a todos los que pusieron sus hombros y sobre todo sus brazos colaborando conmigo y mi tesis. Gracias porque siempre estuvieron ahí tanto en los momentos difíciles como en los momentos gratos. A todo el grupo de Farmacognosia los quiero con todo mi corazón.

Al Doc por darme la posibilidad de pertenecer a su grupo de investigación, por su predisposición y sus sabias palabras cada vez que tuve una duda existencial, por su compromiso con el buen uso de las plantas medicinales y por transmitirnos su pasión por el trabajo. Porque siempre tuvo palabras motivadoras que me incentivaron en el trabajo diario.

A los Coles Gracias! Marce porque siempre tuviste un consejo justo, porque sos una excelente compañera de trabajo, siempre atenta, siempre dispuesta, una buena amiga y sobre todo una excelente persona. A Maty por todas las veces que cantamos Dia de Domingo y Marinero de Luces, por ser una amigaso como pocos, por tu buena onda de siempre, mil gracias por todo.

A las Che-roncas mil gracias por ser mis compinches y agarrarme de mascota cuando era parte de su lado de la fuerza, por ayudarme y apoyarme absolutamente siempre, por aguantarme en los momentos de ataques de gnomo irlandés, por ponerle alegría a cada jornada, por ser mis amigas, las quiero con todo mi gnomo corazón.

A Jesie porque iniciamos este camino juntas, por tus charlas, por las juntadas, porque siempre nos pudimos sentar a hablar de cualquier cosa aunque estuviéramos o no de acuerdo, gracias por el aguante, gracias por preocuparte y por todas las veces que me ayudaste. Te quiero muchísimo amiga.

A las Chulengas, que decirles, me siento super afortunada de haber recorrido este camino juntas, ustedes fueron ese apoyo incondicional, ese otro punto de vista, ese consejo ya sea en la mesada como en la vida, ese abrazo; por los llantos, las broncas, las catarsis grupales, las cervezas, las salidas, las tentadas, las canciones y los bailes en el lab,

por absolutamente todo Gracias. Estoy feliz de haber encontrado en el trabajo amigas tan increíbles como ustedes.

A mis amigas de la vida Ali, Carla, Marian, Mariela y Mai gracias por el aguante, por entender los tiempos, las llegadas tarde, los “hoy tampoco puedo” o los “esta semana estoy hasta las manos”. Por el apoyo para seguir haciendo lo que me gusta. Las quiero con el alma.

A mi familia grande, tíos y primos, gracias por el apoyo de siempre. A mi madrina y mis lelos por su interés por alegrarse con cada logro y alentarme en cada nuevo proyecto. A Vane y Vivi, mis primas de sangre y hermanas de corazón, gracias por estar siempre presentes y compartir conmigo cada paso que doy, por su predisposición para todo y por su aliento de siempre, las quiero un montonazo.

A mis papás, Lila y David, gracias por inculcarme el valor del estudio y del trabajo, por ser ejemplos de que si uno se propone algo y trabaja duro todo se logra. Por alentarme siempre, por hacerme ver que nada es imposible. Por todo lo que hicieron para que yo estudie. Gracias, no hubiera podido llegar hasta acá sin el apoyo incondicional de ustedes. Los amo con toda mi alma.

A mi hermana, Noe, gracias por acompañarme en el día a día, gracias por tu apoyo, gracias por ser mi hermana mayor con todas las letras. Porque siempre te ofreciste para ayudarme, porque me diste consejos, porque lloraste y reírte conmigo. Te amo con todo mi corazón hermana.

A mi familia política, Gringo, Vivi, Abuela, Facu, Negra, Gastón y Sabri, gracias por abrirme las puertas de su familia, gracias por el apoyo que siempre me brindaron, gracias por ser las excelentes personas que son. Los quiero muchísimo.

A Fabián mi compañero de vida, mi amigo, mi amor. Gracias por el aguante de tantos años, por acompañarme y apoyarme en cada proyecto, por entender los horarios, los tiempos, las ausencias. Gracias por ser el pilar que me sostuvo en todo este proceso, por tener siempre la palabra justa, por no dejarme bajar los brazos, por incentivarne a superarme día a día. Gracias por ser como sos.

A cada uno de ustedes Gracias!

Resumen

Algunos efectos secundarios producidos por ciertos antibióticos como gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP) y cloranfenicol (CMP), estarían relacionados a la capacidad que ellos tienen de incrementar el estrés oxidativo en células humanas. Con el fin de llevar a cabo la búsqueda de compuestos naturales que neutralicen la toxicidad de las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) generadas por dichos antibióticos a nivel de circulación sistémica, se evaluó el efecto de 6 flavonoides de variada naturaleza química aislados de especies vegetales autóctonas pertenecientes a los géneros *Flaveria* (Quercetina, ATS, QTS) y *Prosopis* (Luteolina, Vitexina e Isovitexina), como potenciales agentes protectores de los efectos secundarios no deseados inducidos por estos antibióticos en células sanguíneas. Para ello se evaluó el estrés oxidativo *in vitro* (en leucocitos mononucleares y polimorfonucleares humanos), e *in vivo* (vía i.p en ratas), a nivel de producción de ERO, defensas antioxidantes (enzimas antioxidantes endógenas SOD y CAT) y un biomarcador de estrés oxidativo (peroxidación lipídica), determinándose además el efecto de dichos compuestos naturales sobre la actividad antibacteriana de estos antibióticos frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Se comenzó trabajando con GEN, dado que a diferencia de CIP y CMP, éste no poseía estudios en cuanto a la generación de estrés oxidativo en leucocitos humanos, pudiéndose determinar que GEN fue capaz de incrementar la producción de ERO, producir un efecto bifásico en la actividad de las enzimas SOD y CAT dependiente de la concentración y generar un aumento en la peroxidación lipídica en leucocitos humanos mononucleares y polimorfonucleares.

En cuanto al efecto de los flavonoides sobre el estrés oxidativo inducido por GEN *in vitro*, Quercetina y Luteolina fueron los flavonoides más activos, demostrando un importante efecto inhibitorio de la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos humanos, siendo dicha actividad superior al inhibidor de referencia, vitamina C, razón por la cual se continuó trabajando con estos flavonoides a nivel de defensas y biomarcadores de estrés oxidativo. Así, ambos flavonoides tendieron a restablecer la actividad alterada de las enzimas SOD y CAT, y lograron evitar la peroxidación lipídica inducida por este antibiótico. Dichos resultados fueron confirmados *in vivo* en un estudio en ratas, determinándose que tanto Quercetina como Luteolina son capaces de inhibir el Estrés Oxidativo Crónico inducido por GEN a nivel de circulación sistémica, logrando suprimir la generación de ERO, colaborar con SOD y CAT, y disminuir la peroxidación lipídica en sangre entera. Por otra parte, se observaron efectos potenciadores de la actividad antibacteriana de GEN, en combinación con los flavonoides antes mencionados, manifestando a su vez un efecto *aditivo* y *sinérgico* en su interacción con Luteolina. Por último, ambos flavonoides además demostraron un importante efecto protector del estrés oxidativo inducido por CIP y CMP en leucocitos humanos, siendo esta actividad superior a

vitamina C, sin alterar la actividad antibacteriana en la mayoría de los casos y observándose nuevamente efecto *aditivo* y *sinérgico* al combinarlos con Luteolina.

Por lo tanto, la administración simultánea de los flavonoides Quercetina y Luteolina con los antibióticos GEN, CIP y CMP podría representar una potencial opción terapéutica, ya que demuestran un marcado efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por estos antibióticos a nivel de circulación sistémica, lo cual permitiría evitar las consecuencias clínicas causadas por la producción de especies reactivas y RL sin alterar, en algunos casos, e incluso incrementando en otros, la actividad antibacteriana de los mismos.

Abstract

Some side effects of certain antibiotics such as gentamicin (GEN), ciprofloxacin (CIP) and chloramphenicol (CMP) would be related to their ability to increase oxidative stress in human cells. In focus to search natural compounds that neutralize the toxicity of reactive oxygen species (ROS) generated by these antibiotics at the systemic circulation level, the effect of 6 flavonoids with different chemical nature obtained from indigenous species belonging to the genus *Flaveria* (quercetin, ATS, QTS) and *Prosopis* (luteolin, vitexin and isovitexin) was evaluated as potential protective agents for the undesirable side effects induced by these antibiotics in blood cells. For this purpose, oxidative stress was evaluated *in vitro* (in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes), and *in vivo* (via i.p in rats), at the ROS production level, antioxidant defenses (endogenous antioxidant enzymes SOD and CAT) and a oxidative stress biomarker (lipid peroxidation). Also, the effect of those natural compounds on the antibacterial activity of these antibiotics against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was studied.

It was started with GEN, since unlike CIP and CMP, it had not studies on oxidative stress generation in human leukocytes, it being determined that GEN was able to increase the ROS production, produce a biphasic effect on the activity of SOD and CAT enzymes concentration-dependent and generate an increase in lipid peroxidation in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes.

As for the effect of flavonoids on the GEN-induced oxidative stress *in vitro*, quercetin and luteolin, were the most active flavonoids, showing an important inhibitory effect of GEN-induced ROS production in human leukocytes, being this activity superior to the reference inhibitor, vitamin C; for this reason it was continued working with these flavonoids at the level of defenses and biomarkers of oxidativestress. Thus, both flavonoids tended to restore the altered activity of SOD and CAT enzymes, and managed to avoid the lipid peroxidation induced by this antibiotic. These results were confirmed *in vivo* in a study in rats. Both quercetin and luteolin are able to inhibit the GEN-induced Chronic Oxidative Stress at the systemic circulation level, succeeding in suppressing ROS generation, collaborating with SOD and CAT, and decrease lipid peroxidation in whole blood. On the other hand, potentiating effects of the antibacterial activity of GEN, in combination with the above-mentioned flavonoids, were observed, showing in turn an additive and synergistic effect in its interaction with luteolin. Finally, both flavonoids also showed an important protective effect of oxidative stress induced by CIP and CMP in human leukocytes, being this activity superior to vitamin C, without altering the antibacterial activity in the majority of the cases and again observing additive and synergistic effect to the combine them with luteolin.

Therefore, simultaneous administration of the flavonoids quercetin and luteolin with the antibiotics GEN, CIP and CMP could represent a potential therapeutic

option, since they demonstrate a marked protective effect against the oxidative stress induced by these antibiotics at the systemic circulation level, which would allow to avoid the clinical consequences caused by the production of reactive species and free radicals without altering, in some cases, and even increasing in others, the antibacterial activity of the same.

Índice General

<i>Abreviaturas y Símbolos</i>	IX
<i>Introducción</i>	3
CAPÍTULO 1: Antecedentes	
1.1. Radicales Libres y Estrés Oxidativo	7
1.1.1. Concepto de Radical Libre y Especies Reactivas del Oxígeno	7
1.1.2. Principales Especies Reactivas del Oxígeno	8
1.1.3. Principales fuentes de Especies Reactivas del Oxígeno	10
1.1.3.1. <i>Fuentes endógenas</i>	11
1.1.3.2. <i>Fuentes exógenas</i>	12
1.1.4. Consecuencias del estrés oxidativo	13
1.1.4.1. <i>Principales macromoléculas dianas de las ERO</i>	15
1.2. Estrés Oxidativo en Leucocitos Humanos	17
1.3. Antibióticos y ERO: Gentamicina, Ciprofloxacina y Cloranfenicol	21
1.4. Estrategias celulares contra las Especies Reactivas del Oxígeno.	
Defensas Antioxidantes	26
1.4.1. Antioxidantes endógenos	27
1.4.2. Antioxidantes exógenos	29
1.5. Flavonoides: Características y Actividad Antioxidante	31
1.5.1. Actividad antioxidante de flavonoides	33
1.6. Antecedentes de Especies Vegetales abordadas en el presente estudio ..	36
1.6.1. Género <i>Flaveria</i> Juss.	36
1.6.1.1. <i>Antecedentes de la especie Flaveria bidentis (L.) Kuntze</i>	36
1.6.2. Género <i>Prosopis</i> L.	40
1.6.2.1. <i>Antecedentes de la especie Prosopis nigra (Gris.) Hieron</i>	40
1.6.2.2. <i>Antecedentes de la especie Prosopis strombulifera (Lam.) Benth var.</i> <i>strombulifera</i>	43
1.7. Bibliografía	47
CAPÍTULO 2: Objetivos	
2.1. Objetivo General	61

2.2. Objetivos Específicos	61
---	----

CAPÍTULO 3: Extracción, purificación e identificación de flavonoides

3.1. Flavoides del género <i>Flaveria</i>: <i>F. bidentis</i>	65
3.1.1. Material vegetal	65
3.1.2. Extracción y purificación de flavonoides	65
3.1.3. Identificación de flavonoides	66
3.2. Flavoides del género <i>Prosopis</i>: <i>P. strombulifera</i> y <i>P. nigra</i>	70
3.2.1. Material vegetal	70
3.2.2. Extracción y purificación de flavonoides	71
3.2.3. Identificación de flavonoides	72
3.3. Bibliografía	76

CAPÍTULO 4: Efecto de Gentamicina sobre la producción de ERO, defensas antioxidantes y un biomarcador de estrés oxidativo en leucocitos humanos

4.1. Introducción	81
4.2. Objetivo	82
4.3. Metodología	82
4.3.1. Obtención de leucocitos humanos: Mononucleares y Polimorfonucleares... 83	
4.3.2. Determinación de viabilidad celular en leucocitos humanos	83
4.3.3. Determinación de ERO intracelulares mediante fluorescencia	84
4.3.4. Determinación de la actividad Superóxido Dismutasa	85
4.3.5. Determinación de la actividad Catalasa	85
4.3.6. Evaluación de la Peroxidación Lipídica	86
4.3.7. Análisis Estadístico.....	87
4.4. Resultados y Discusión	87
4.4.1. Viabilidad celular de leucocitos humanos expuestos a GEN	87
4.4.2. Determinación de ERO intracelulares	88
4.4.3. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes endógenas	90
4.4.4. Evaluación de la peroxidación lipídica	92
4.5. Conclusiones Parciales	93
4.6. Bibliografía	93

CAPÍTULO 5: Efecto de flavonoides sobre el estrés oxidativo inducido por Gentamicina en leucocitos humanos in vitro

5.1. Introducción	99
5.2. Objetivos	100
5.3. Metodología	100
5.3.1. Obtención de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares humanos. Determinación de viabilidad celular.....	100
5.3.2. Determinación de ERO intracelulares mediante fluorescencia	100
5.3.3. Determinación de la actividad Superóxido Dismutasa y Catalasa	101
5.3.4. Evaluación de la Peroxidación Lipídica	101
5.3.5. Análisis Estadístico.....	102
5.4. Resultados y Discusión	102
5.4.1. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos mononucleares humanos.....	102
5.4.2. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducida por GEN en leucocitos polimorfonucleares humanos	111
5.4.3. Efecto de flavonoides sobre la actividad Superóxido Dismutasa y Catalasa modificada por GEN en leucocitos humanos	115
5.4.4. Efecto de flavonoides sobre la peroxidación lipídica inducida por GEN en leucocitos humanos	118
5.5. Conclusiones Parciales	120
5.6. Bibliografía	121

CAPÍTULO 6: Efecto de flavonoides frente el estrés oxidativo inducido por Gentamicina in vivo

6.1. Introducción	125
6.2. Objetivo	127
6.3. Metodología	127
6.3.1. Animales	127
6.3.2. Diseño Experimental	128
6.3.3. Preparación de las muestras y parámetros a evaluar	128
6.3.4. Análisis Estadístico.....	129
6.4. Resultados y Discusión	129
6.5. Conclusiones Parciales	134

6.6. Bibliografía.....	135
------------------------	-----

CAPÍTULO 7: Actividad antimicrobiana de Gentamicina en combinación con flavonoides

7.1. Introducción.....	141
7.2. Objetivos	144
7.3. Metodología	144
7.3.1. Cepas bacterianas	144
7.3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de flavonoides.....	144
7.3.3. Evaluación de la interacción entre GEN y los flavonoides por el método del Tablero de Ajedrez.....	145
7.4. Resultados y Discusión	145
7.4.1. Determinación de la actividad antibacteriana de los flavonoides quercetina y luteolina	145
7.4.2. Efecto de los flavonoides quercetina y luteolina sobre la actividad antibacteriana de GEN.....	146
7.5. Conclusiones Parciales.....	152
7.6. Bibliografía.....	152

CAPÍTULO 8: Efecto de flavonoides frente al estrés oxidativo inducido por Ciprofloxacina y Cloranfenicol en leucocitos humanos. Efecto sobre la actividad antibacteriana.

8.1. Introducción.....	159
8.2. Objetivos	161
8.3. Metodología	161
8.3.1. Obtención de leucocitos humanos. Determinación de viabilidad celular	161
8.3.2. Determinación de ERO intracelulares mediante fluorescencia	162
8.3.3. Evaluación de la interacción entre antibióticos y flavonoides por el método del Tablero de Ajedrez.....	162
8.3.4. Análisis Estadístico.....	163
8.4. Resultados y Discusión	163
8.4.1. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducida por CIP y CMP en leucocitos mononucleares humanos.....	163
8.4.2. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducida por CIP y CMP en leucocitos polimorfonucleares humanos.....	163
8.4.3. Efecto de flavonoides sobre la actividad antibacteriana de CIP y CMP	169
8.5. Conclusiones Parciales.....	178

8.6. Bibliografía	179
<i>Conclusiones Generales</i>	185
<i>Proyecciones y Publicaciones</i>	189
<i>Apéndice 1: Soluciones buffers y medios de cultivo</i>	191



Abreviaturas y Símbolos



Abreviaturas y Símbolos

% p/v	porcentaje peso/volumen
% v/v	porcentaje volumen/volumen
°C	grados Celsius
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
µg	microgramos
µL	microlitros
µM	micromolar
ABTS	ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin- 6- sinfónico)
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMP	colección Ana María Planchuelo – Herbario ACOR
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosina trifosfato
ATS	acetil trisulfato de quercetina
CAT	catalasa
CC	cromatografía en columna
CCD	cromatografía en capa delgada
Cd	cadmio
CHCl ₃	cloroformo
CIF	Concentración Inhibitoria Fraccional
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CIP	ciprofloxacina
CMP	cloranfenicol
CORD	Museo Botánico de la Universidad Nacional de Córdoba
CP	cromatografía en papel
Cr	romo
Cu	cobre
CYP	complejo citocromo P450
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético

ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
EtOH	etanol
Fe	hierro
FE	fase estacionaria
FM	fase móvil
g	gramos
GEN	gentamicina
Glu	glucosa
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación disulfuro oxidado
H ₂ -DCFDA	2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O	agua
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HBSS	solución salina balanceada de Hanks
HBrO	ácido hipobromoso
HCl	ácido clorhídico
HClO	ácido hipocloroso
Hg	mercurio
HO•	radical hidroxilo
HOO•	radical hidroperoxilo
CLAP	Cromatografía Líquida de Alta Performance
CLAP-EM	Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometría de Masas
h	horas
ICIF	Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
i.p	intraperitoneal
Iv	isovitexina
kg	kilogramos

L	luteolina
M	molar
MDA	malondialdehído
mg	miligramos
MH	Mueller-Hinton
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
Mn	manganeso
MN	mononucleares
MPO	mieloperoxidasa
N	normal
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBT	nitroazul de tetrazolio
NH ₃	amoníaco
Ni	níquel
nm	nanómetros
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
O ₂	oxígeno molecular
O ₂ ^{•-}	radical anión superóxido
¹ O ₂	oxígeno singlete
O ₃	ozono
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	peroxinitrito
p	pico
PBS	buffer salino de fosfato
PMN	polimorfonucleares
Q	quercetina
QTS	tetrasulfato de quercetina
Ram	ramnosa
Rf	relación de frente

RL	radicales libres
RO [•]	radical alcoxilo
ROO [•]	radical peroxilo
ROOH	hidroperóxidos
rpm	revoluciones por minuto
sh	shoulder
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
t _R	tiempo de retención
URF	Unidades relativas de fluorescencia
U _{CAT}	Unidades de actividad catalasa
UE	Unidades enzimáticas
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
U _{SOD}	Unidades de actividad superóxido dismutasa
UV	ultravioleta
V	vitexina
W	vatio (watt)
Zn	zinc



Introducción



Introducción

Desde el inicio de los tiempos el ser humano ha sido víctima de diversas patologías que han afectado su calidad de vida e incluso han provocado la muerte de miles de personas en todo el planeta. Desde el descubrimiento de los radicales libres como agentes duales que, amén de producir efectos beneficiosos para la homeostasis del cuerpo también son causantes de cambios bioquímicos que pueden desencadenar diversas patologías, el estudio de los efectos tóxicos de estas especies reactivas y su relación con diversas patologías es un tema de investigación constante.

Con el fin de poder hacer frente a los distintos males a los cuales el hombre estaba expuesto, se desarrollaron fármacos que permitieron aumentar la expectativa y la calidad de vida de las personas, sin embargo, dada la amplia distribución que ellos poseen tras ser administrados a dosis terapéuticas, logran no sólo alcanzar las dianas específicas para desarrollar su actividad farmacológica principal, sino que también pueden desencadenar cambios en otro tipo de células y tejidos y generar lo que conocemos como reacciones adversas a un medicamento.

En las últimas décadas muchas investigaciones han asociado los efectos secundarios no deseados de diversos fármacos con la producción excesiva de radicales libres. Estudios han demostrado que algunos antibióticos son capaces de generar estrés oxidativo en tejidos y células humanas y que, esta producción exacerbada de especies reactivas estaría relacionada con los efectos secundarios nocivos que ellos generan. Estos efectos adversos incluso son de tal envergadura, que algunos antibióticos han entrado en uso restringido en los últimos años debido a su importante toxicidad, sin embargo, dado el problema actual que plantea la alta resistencia bacteriana a los antibióticos de uso convencional, es necesario buscar nuevas estrategias para combatir a los diversos patógenos bacterianos. Entre las principales tácticas que se llevan a cabo para lograr este importante objetivo se encuentran por un lado la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos, y por el otro el logro de distintas estrategias farmacológicas que permitan recuperar aquellos antibióticos potentes que han entrado en uso restringido y mejorar las terapias actuales con los antibacterianos de uso frecuente, y es este segundo propósito, hacia donde apunta la presente tesis doctoral.

La naturaleza es una fuente inagotable de compuestos químicos que han sido utilizados desde tiempos remotos para el alivio de numerosa enfermedades, por lo cual se plantea la búsqueda de antioxidantes naturales, particularmente flavonoides provenientes de especies vegetales autóctonas, que tengan la capacidad de contrarrestar los efectos secundarios no deseados inducidos por ciertos antibióticos que se relacionan con un aumento de estrés oxidativo en el organismo, con el fin de poder aportar coadyuvantes a la medicación que permitirían disminuir los efectos secundarios sin modificar la actividad antimicrobiana de dichos fármacos.



Capítulo 1:
Antecedentes



1.1 Radicales Libres y Estrés Oxidativo.

1.1.1 Concepto de Radical Libre y Especies Reactivas del Oxígeno

En la actualidad, existe un campo de investigación de gran interés dentro de las especialidades biomédicas que involucra el estudio de mecanismos de acción y efectos citotóxicos que presentan los Radicales Libres (RL) y/o las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) con el objeto de develar el papel de estas especies sobre los mecanismos fisiopatológicos de numerosas enfermedades.

Los RL pueden ser definidos como especies moleculares activadas, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado (simbolizado por un “•”), pueden existir en forma independiente y, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, poseen una alta e indiscriminada reactividad (Boots y col., 2008).

Esta alta reactividad provoca que muchas reacciones radical-radical y radical-molécula, tengan lugar tan pronto como las dos moléculas se encuentren. En los seres vivos, la concentración del RL es normalmente muy baja, y raramente adquiere valores suficientemente altos como para provocar una reacción radical-radical que reemplace a una reacción radical-molécula. Así, las reacciones radical-radical son menos frecuentes, aunque ocurren, como en el caso de la reacción entre óxido nítrico (NO) y radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), mientras que la reacción radical-molécula se ve favorecida por la concentración de la molécula que va a reaccionar, en comparación con la concentración del radical. La alta reactividad de los RL además de ser la base de su toxicidad, provoca que su vida media sea muy corta, del orden de los milisegundos, variando según el RL de que se trate (Witmer y col., 1991).

En los sistemas biológicos, los RL se están formando continuamente, siendo los más abundantes y reactivos, las moléculas derivadas del oxígeno. También existen RL, y sus especies reactivas asociadas, centrados en elementos como nitrógeno, cloro, bromo, azufre y carbono (Halliwell, 2006; Korycka-Dahi y Richardson, 1981).

Especies Reactivas del Oxígeno es un término que se aplica colectivamente a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto a los RL como a ciertas especies no radicalarias que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertidas en radicales (Halliwell y Gutteridge, 1999). En la tabla 1.1 se presentan las principales ERO.

Tabla 1.1: Especies Reactivas del Oxígeno

	Radicales	No Radicales
ERO	Anión Superóxido $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de Hidrógeno H_2O_2
	Hidroxilo HO^{\bullet}	Ácido Hipocloroso $HOCl$
	Alcoxilo RO^{\bullet}	Ácido Hipobromoso $HOBr$
	Peroxilo ROO^{\bullet}	Ozono O_3
	Hidroperoxilo HOO^{\bullet}	Oxígeno Singlete 1O_2

1.1.2 Principales Especies Reactivas del Oxígeno

Para comenzar a hablar de las características de las principales ERO, es importante destacar que no todas las especies reactivas presentan la misma capacidad de reacción o son igual de reactivas. Ciertos compuestos como H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$, reaccionan de forma relativamente selectiva con solo ciertas moléculas biológicas *in vivo*, mientras que el radical HO^{\bullet} es altamente reactivo, ya que reacciona instantáneamente con cualquier molécula que encuentre. Otra característica que diferencia a las ERO es el sitio donde actúan; los RL reaccionan casi al instante en el lugar de su formación debido a su elevada reactividad, mientras que las ERO no radicalarias, como el H_2O_2 , pueden atravesar membranas biológicas y extender así su campo de acción y su potencial toxicidad a zonas alejadas de su sitio de formación y durante períodos de tiempo más largos (Kohen y Nyska, 2002).

Algunas de las principales ERO son:

🌀 Radical Anión Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

El $\text{O}_2^{\bullet-}$ procede de la reducción univalente del oxígeno molecular (O_2), presenta una vida media del orden de milisegundos y si bien no difunde libremente como otras ERO, puede penetrar las membranas por medio de canales aniónicos. Sus principales fuentes son la cadena respiratoria mitocondrial, las células fagocíticas y como producto de diferentes reacciones de enzimas como NADPH oxidasa, xantina oxidasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, citocromo p450, entre otras, y por autooxidación de otras moléculas. Es una especie relativamente poco reactiva, pero potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que dan lugar a la formación de otras ERO más reactivas. El daño biológico que puede causar es muy selectivo, suele producir reacciones con otros radicales, tal como la reacción con el NO para generar peroxinitrito (ONOO^-) el cual es tóxico, puede reaccionar con grupos tioles o con iones Fe que contienen determinadas proteínas, y en este sentido, un importante mecanismo por el cual el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es tóxico para las células, es la liberación del Fe necesario para la reacción de Fenton desde las proteínas que contienen este ion y de los clusters de Fe de la cadena respiratoria (Boveris y col, 1972; Halliwell, 2012; Halliwell y Gutteridge, 1999; Pisoschi y Pop, 2015; Valko y Moris, 2005).

La reacción por la cual se forma anión superóxido por reducción del oxígeno es:



🌀 Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

En este caso se trata de una especie no radicalaria, dado que sus electrones se encuentran todos apareados, sin embargo, es considerada una especie precursora de

otros RL. En los medios biológicos puede ser producida por enzimas oxidasas, el complejo citocromo P450 y químicamente a través de dos vías:

Por reducción directa del oxígeno:



O por dismutación del radical anión superóxido:



El H_2O_2 es la forma menos reactiva y la más estable de las ERO. Su principal importancia radica en su capacidad de atravesar membranas biológicas, por lo que puede generar reacciones de oxidación en sitios alejados del lugar donde es producido, y si bien no es tóxico a concentraciones fisiológicas, una vez que difunde puede convertirse en otro radical, el radical HO^{\cdot} por la reacción Fenton/Haber-Weiss (Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934).

El H_2O_2 actúa como un conducto para transmitir daño inducido por RL en todos los compartimentos celulares y entre las células. El daño que puede producir va a depender de la disponibilidad de Fe^{2+} y Cu^{2+} , ya que ambos iones catalizan la formación de HO^{\cdot} a partir de H_2O_2 . Si bien es poco reactivo, es capaz de oxidar los grupos tioles de las proteínas, atacar el grupo hemo produciendo la liberación de Fe, y oxidar lípidos y ADN (Halliwell y Cross 1994; Halliwell y Gutteridge, 1999; Kohen y Nyska, 2002; Kurutas, 2016).

🔗 Radical Hidroxilo (HO^{\cdot})

El radical HO^{\cdot} es el más perjudicial de los RL por su alta reactividad. Su vida media es muy corta, de un nanosegundo, pero reacciona con todas las macromoléculas de su entorno causando disfunción celular, induciendo de esta forma daño en los diferentes tejidos. Su elevada reactividad hace que su acción química quede reducida a la estricta vecindad del lugar de producción. En los organismos vivos la principal fuente es la descomposición de H_2O_2 en presencia de metales de transición, la reacción de Haber-Weiss es activada en presencia de cationes Fe (III) generados en la reacción de Fenton (Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934).



En cuanto al daño que pueden generar, los radicales HO^{\cdot} se han reportado como los radicales oxidantes más potentes capaces de interactuar con gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas tales como ADN, lípidos, proteínas, aminoácidos,

azúcares y metales, más específicamente son las principales ERO capaces de iniciar la reacción de lipoperoxidación al abstraer un átomo de H del grupo metileno (-CH₂) perteneciente a un ácido graso poliinsaturado. Si bien existen enzimas capaces de detoxificar al organismo de O₂^{•-} y H₂O₂, los organismos vivos no han desarrollado sistemas enzimáticos para barrer radicales hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1999; Kohen y Nyska, 2002; Pisoschi y Pop, 2015).

❧ Radicales Alcoxilo (RO[•]) y Peroxilo (ROO[•])

Los radicales ROO[•] son probablemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, sin embargo, no son tan reactivos como otras ERO. Se pueden originar a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado. Este radical tiene una vida media relativamente larga (del orden de los segundos).



Si bien no son tan reactivos como el radical HO[•], tanto los radicales RO[•] como ROO[•] son muy importantes en la fase de inicio y propagación de la peroxidación lipídica ya que son capaces de abstraer un átomo de H de otras moléculas. Se generan durante la oxidación de lípidos, cuando otros radicales actúan sobre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de las colas de los fosfolípidos que forman las membranas celulares y por descomposición de peróxidos orgánicos o hidroperóxidos (ROOH), reacción catalizada por metales de transición (Halliwell y Chirico, 1993).

❧ Ácido Hipocloroso (HClO)

Al igual que el H₂O₂ y el ¹O₂, el HClO no se puede considerar un RL en sí, pero se incluye dentro del término ERO, por su capacidad para oxidar importantes biomoléculas, así como producir e interactuar con otros RL. El HClO se produce debido a la presencia de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en macrófagos y neutrófilos, la cual es responsable de la generación catalítica de HClO a partir de H₂O₂ en presencia de anión cloruro.



Esta especie reactiva está dotada de altas capacidades oxidantes, induciendo la cloración oxidativa en biomoléculas tales como lípidos, proteoglicanos, aminoácidos, y también de otros compuestos intracelulares (Pisoschi y Pop, 2015).

1.1.3 Principales fuentes de Especies Reactivas del Oxígeno

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de ERO que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, por exposición del organismo a diversos agentes externos (Dreosti, 2000).

1.1.3.1 Fuentes endógenas

Podemos distinguir varias fuentes endógenas que originan la mayoría de los agentes oxidantes producidos por las células:

🔗 Cadena respiratoria

En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O con el fin de obtener energía (ATP), mediante la transferencia de electrones. Sin embargo, inevitablemente a lo largo de este proceso, entre el 5 y 10 % del O_2 consumido sufre una reducción monovalente por electrones que escapan del control mitocondrial, dando lugar a la formación de subproductos oxidantes (Al-Gubory y col, 2010). Los agentes oxidantes derivados de la reducción monovalente del O_2 son:



🔗 Células fagocíticas

Los leucocitos neutrófilos, eosinófilos y monocitos/macrófagos al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo en el cual se producen grandes cantidades de $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} , NO y OCl^{\bullet} . Si bien este proceso es crítico para el normal funcionamiento del sistema inmune, el resultado neto es la liberación de importantes cantidades de ERO extracelulares, y en caso de que las infecciones resulten crónicas ocurre una actividad fagocítica continua que provoca daño en los tejidos e inflamación crónica (Forman y Torres, 2001; Kehrer y col., 2015).

🔗 Autooxidación de pequeñas moléculas

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas y flavinas. En todos los casos, el radical primario que se forma es el $O_2^{\bullet -}$, además de H_2O_2 como producto secundario, generado a partir de la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ espontáneamente o catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Kehrer y col., 2015).

🌀 **Complejo citocromo P450 (CYP)**

El retículo endoplasmático contiene una familia de enzimas (complejo citocromo P450) las cuales son las principales responsables del metabolismo oxidativo de una amplia variedad de sustancias químicas (xenobióticos) tales como fármacos, productos químicos y esteroides, transformándolos en productos más solubles que puedan ser fácilmente eliminados del organismo. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden producir daño en el ADN (Zangar y col., 2004).

🌀 **Peroxisomas y Enzimas Oxidasas**

Los peroxisomas son orgánulos citoplasmáticos encargados de la metabolización de ácidos grasos los cuales contienen enzimas que oxidan diferentes sustratos generando H_2O_2 como subproducto, el cual es degradado de forma natural por la enzima catalasa (CAT), aunque, bajo ciertas condiciones, algunos peróxidos pueden escapar de esta degradación y liberarse a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación. A su vez en el citoplasma celular existen diversas enzimas oxidasas capaces de oxidar sustancias endógenas y exógenas y generar ERO, tales como la xantina oxidasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, acoplando a dicha oxidación una reducción monovalente del O_2 , con la consiguiente formación de $O_2^{\cdot-}$; otras oxidasas capaces de generar ERO son la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, ciclooxigenasas, lipooxigenasas, monooxigenasas, entre otras (Ballester, 1996; Dröge, 2002).

1.1.3.2 Fuentes exógenas

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres se destacan:

🌀 **Contaminantes**

Los óxidos de nitrógeno (NO_x) del humo del tabaco, contaminantes aéreos fotoquímicos, pesticidas, solventes, polvos de minerales, ozono, hidrocarburos aromáticos, monóxido de carbono y diversas toxinas son agentes que o bien poseen RL, o se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, 1982; Halliwell y Cross, 1994).

🌀 **Iones metálicos**

Las sales de hierro y cobre promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos mediante la reacción de Fenton (Página 9) (Fenton, 1894; Kohen y

Nyska, 2002). Otros iones metálicos tales como Cd, Ni, Cr y Hg, catalizan numerosas reacciones que llevan a la producción de especies reactivas (Wang y col, 2013).

☞ Radiaciones

Las radiaciones electromagnéticas (ultravioleta, rayos X y rayos gamma) o radiaciones corpusculares (electrones, protones, neutrones) son capaces de interactuar con el agua y el oxígeno molecular generando de esta forma distintas ERO (Kim y col, 2016; Yan y col, 2016)

☞ Fármacos

Fármacos pertenecientes a diferentes grupos terapéuticos pueden afectar el equilibrio redox. Muchos agentes antineoplásicos, tales como los antibióticos bleomicina y adriamicina, son ejemplos de ello, ya que se ha descrito que el daño que produce bleomicina al ADN estaría mediado por ERO que resultan de la interacción del fármaco con un ion metálico y oxígeno (Dedon y Goldberg, 1992), mientras que los efectos tóxicos de adriamicina están relacionados con la formación de RL, resultado de la reducción del fármaco por la enzima NADPH-P450, generando un radical semiquinona que en presencia de oxígeno da lugar al radical $O_2^{\bullet-}$ (Goodman y Hochstein, 1977). Algunos antidepresivos tricíclicos, glucocorticoides (Arai y col., 2000), acetaminofeno (Jiang y col., 2015), nitrofurantoínas y algunos antibióticos tales como gentamicina, ciprofloxacina y cloranfenicol (Páez y col., 2008; Becerra y col., 2003), han sido descritos como generadores de ERO en distintos tejidos y células humanas. En esta tesis nos centraremos en los antibióticos como inductores de estrés oxidativo por lo cual en las próximas secciones se profundizará sobre este tema.

1.1.4 Consecuencias del estrés oxidativo

La formación tanto de RL, como del conjunto de especies reactivas que se les asocian, en células con metabolismo aeróbico, es un proceso normal e inevitable, ya sea como producto de desecho de una reacción química dada o como producto con una función bioquímica en el organismo.

Estas ERO juegan un rol central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que mantienen el estado fisiológico de los organismos. En mamíferos, participan activamente en diversas funciones celulares como la activación génica, el crecimiento celular, la apoptosis, la modulación de diversas reacciones químicas y el control de la homeostasis (regulando los procesos de fosforilación de enzimas y factores de transcripción); además las ERO participan en muchos procesos fisiopatológicos tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo

de defensa del organismo frente a estos agresores (Halliwell y Gutteridge, 1999). Participan además en el metabolismo de xenobióticos y en el desarrollo embrionario y se les atribuye una papel relevante como mediadores de la síntesis de otras moléculas, como prostaglandinas, y como moléculas de señalización tanto en la célula como entre células (Sen, 2000). Es por ello que la generación de ERO presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.

Tanto las células procariotas como las eucariotas se han adaptado para co-existir con las ERO, de esta forma regulan y se defienden de estas especies reactivas mediante una gran cantidad de mecanismos antioxidantes que permiten detoxificar el organismo, sin embargo, cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce la situación denominada “Estrés Oxidativo”, que en mayor o menor grado puede llegar a producir lesiones reversibles o irreversibles (Sies, 1986).

La alteración en los niveles normales de ERO induce daño oxidativo a las principales biomoléculas del organismo tales como ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas, provocando una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales dan por resultados lesiones en el ADN, pérdida de la función enzimática, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización en la célula y, en casos extremos muerte celular por necrosis o apoptosis (Kim y col., 2006).

El estrés oxidativo puede provenir de una deficiencia del sistema de defensas antioxidantes, de un incremento excesivo de la producción de ERO o de una combinación de ambas, de cualquier modo, esta situación de desbalance está directamente relacionada a las principales patologías que provocan la muerte de las personas o deterioran su calidad de vida, ya que este desequilibrio favorece procesos tumorales, ulcerosos, inflamatorios, neurológicos, diabetes, cardiomiopatías y diversas enfermedades autoinmunes y degenerativas (Figura 1.1) (Boots y col., 2008; Buonocore y col., 2010; Halliwell y Gutteridge, 1999).

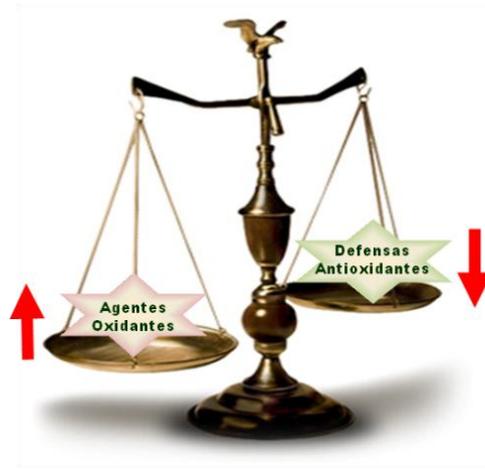


Figura 1.1: Desbalance ocurrido durante el estrés oxidativo.

Pero, ¿cómo actúan exactamente las ERO? El mecanismo de “ataque” a las estructuras biológicas se inicia cuando el RL le sustrae un átomo de hidrógeno o, alternativamente un electrón, a la molécula diana, lo que convertirá al electrón no apareado del radical en un par de electrones más estable (Figura 1.2). Dado que desde un punto de vista electroquímico la molécula se oxida al perder el hidrógeno o el electrón, los RL y especies reactivas se conocen como prooxidantes (Boots y col, 2008)

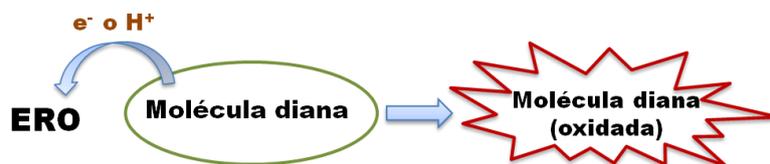


Figura 1.2: Mecanismo de ataque de las ERO.

1.1.4.1 Principales macromoléculas dianas de las ERO

🔗 Acciones sobre Lípidos

Una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducidos por los RL son los ácidos grasos poliinsaturados presentes, mayoritariamente, en las membranas celulares. El daño a los lípidos consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La reacción de oxidación (Figura 1.3) se inicia cuando el RL extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno ($-CH_2-$) de la cadena del ácido graso diana convirtiéndose así en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad formando un dieno conjugado y reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical ROO^{\bullet} . En la etapa de propagación, este radical ROO^{\bullet} dará lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso y, así sucesivamente se generará una reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica, la cual se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra. La reacción en cadena finalizará cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones, (1) se consume una de las moléculas reactivas, es decir, los ácidos grasos o el oxígeno, (2) se forma un radical relativamente poco reactivo o (3) dos radicales al reaccionar forman un par no radical. Entre los productos finales que se forman durante la peroxidación lipídica se incluyen, entre otros: 4-hidroxi alquenes, 2-alquenes, isoprostanos y el malondialdehído (MDA); este último presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases del ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas que pueden estar implicadas en la patogenia de varias enfermedades, además de atacar los grupos sulfidrilos ($-SH$) de las proteínas generando entrecruzamientos intra e intermoleculares (Ayala y col., 2014; Boots y col., 2008).

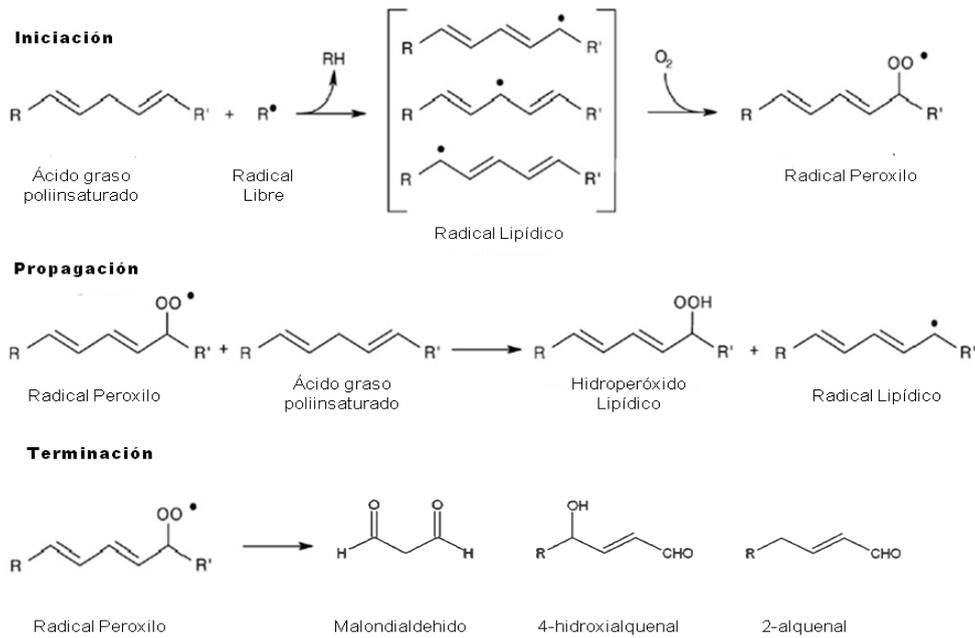


Figura 1.3: *Proceso de peroxidación lipídica iniciada por el radical R^\bullet (adaptado de Boots y col., 2008).*

Generalmente el radical HO^\bullet , el 1O_2 y quizás el H_2O_2 pueden iniciar la reacción de peroxidación lipídica, ya que el $O_2^{\bullet-}$ es menos reactivo, afectando las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, dando como resultado una pérdida de la flexibilidad de la membrana, ruptura de los gradientes iónicos transmembrana y con ello pérdida de la funcionalidad celular. La lipoperoxidación es un proceso continuo y fisiológico que en condiciones normales actúa como renovador de las membranas biológicas, sin embargo, su excesiva activación está relacionada con la patogénesis de numerosas enfermedades y procesos patológicos (Halliwell y Chirico, 1993).

🔗 Acciones sobre Proteínas

La acción de los RL sobre las proteínas se ejerce sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol ($-SH$), los cuales pueden ser transformados en puentes disulfuro ($S=S$). Así, proteínas ricas en determinados aminoácidos sensibles a las ERO (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína) pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales. De este modo, el efecto de los RL sobre una determinada proteína va a depender de su composición de aminoácidos, de la localización de los aminoácidos que median la conformación y actividad de la proteína, así como de la posibilidad de reparación de la lesión (Davies, 1987; Pisoschi y Pop, 2015).

Las proteínas pueden ser dañadas directa o indirectamente principalmente por el contacto con HO^\bullet , el cual provoca una rápida desnaturalización de la proteína y un aumento de su hidrofobicidad, mientras que el radical $O_2^{\bullet-}$ puede actuar potenciando

el daño producido cuando se encuentra en combinación con HO^\bullet . Además, estudios han demostrado que el H_2O_2 y las formas reducidas de Fe y Cu, generados por oxidasas de función mixta, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo RL que oxidan inmediatamente a los residuos aminoácidos vecinos. Como consecuencia se producen conversiones de unos aminoácidos en otros y/o se forman grupos carbonilo que impiden el normal desarrollo de sus funciones (Davies y col., 1987; Stadtman, 1993).

Los daños provocados a las proteínas incluyen peroxidación, formación de grupos carbonilo, reacciones con aldehídos, entrecruzamientos proteína-proteína, cambios en la estructura terciaria, desnaturalización, alteración de determinados residuos aminoácidos e incluso fragmentación, inactivación y degradación proteica (Trnková y col., 2015). Como consecuencia de ello, pueden ocurrir pérdidas de actividad enzimática, alteraciones de funciones celulares como la producción de energía, interferencias con la creación de potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares (Kohen y Nyska, 2002).

🔗 Acciones sobre Ácidos Nucleicos

El ADN por su parte, tampoco escapa del ataque de las ERO, especialmente del radical HO^\bullet y en menor medida, el H_2O_2 .

Los daños pueden presentarse en forma de modificaciones de las bases o fragmentaciones en las cadenas del ADN, translocaciones, desmetilaciones, pérdida de purinas, daños en la desoxirribosa, cruces entre cadenas de ADN o entre proteínas y ADN y alteraciones en los sistemas de reparación de ésta molécula (Dizdaroglu y col., 2002; Waris y Ahsan, 2006). El número de productos del ataque de las bases del ADN por RL supera la veintena, entre ellos la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es la alteración que se observa con más frecuencia, por lo cual se la emplea como marcador de ataque oxidativo al ADN, y su importancia reside en su alto efecto mutagénico, ya que ésta, durante la replicación del ADN, se empareja con adenina en lugar de hacerlo con citosina (Shibutani y col., 1991; Pisoschi y Pop, 2015).

Al llevar a cabo el estudio del desbalance redox en sistemas biológicos, los productos de oxidación tanto de lípidos, como de proteínas y ADN pueden ser empleados como biomarcadores de estrés oxidativo, permitiendo reflejar así las alteraciones derivadas del ataque de las ERO sobre las principales macromoléculas biológicas (Pisoschi y Pop, 2015).

1.2 *Estrés Oxidativo en Leucocitos Humanos*

Los leucocitos, también llamados glóbulos blancos, son un componente importante de la sangre y una pieza clave en el sistema inmunológico del cuerpo,

interviniendo así en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos. Los leucocitos derivan de células madre de la médula ósea y tienen tres categorías principales: linfocitos, fagocitos, y células auxiliares.

Existen tres tipos de **linfocitos**: los linfocitos T y las células natural killers que atacan células de tumores y células infectadas con virus, y las células B que producen anticuerpos que ayudan a los fagocitos a reconocer material extraño.

Los **fagocitos** son células que engullen partículas extrañas, incluyendo agentes infecciosos, como bacterias, virus, hongos y parásitos. Los neutrófilos, monocitos y eosinófilos son las principales células fagocíticas que buscan, atrapan y destruyen partículas extrañas. Los **neutrófilos** representan el 50-70 % de los leucocitos sanguíneos, son fagocitos profesionales que pueden atacar y destruir bacterias y virus incluso en la sangre circulante. Poseen gránulos especializados en el citoplasma con sustancias que les permiten degradar todo aquello que incorporan en el proceso de fagocitosis. Los gránulos primarios (azurófilos) son lisosomas que contienen entre otros, hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa y lisozima. Los gránulos secundarios o específicos contienen lactoferrina, fagocitina, NADPH oxidasa y lisozima, entre otros. Todas estas sustancias contenidas en los gránulos poseen potentes actividades contra los microorganismos y partículas extrañas. Los **monocitos** son células más grandes que otros leucocitos. Estas células inmaduras poseen menor capacidad para luchar contra los agentes infecciosos, sin embargo, una vez que entran en los tejidos se constituyen por un lado en macrófagos tisulares, que se encargan de remover restos de células dañadas o muertas y de atacar microorganismos como virus y bacterias, y por el otro, en células dendríticas, que procesan material antigénico y lo presentan a los linfocitos T para que éstos puedan reconocerlos y eliminarlos. Tanto monocitos como macrófagos poseen una batería enzimática semejante a los neutrófilos, aunque en menor medida que éstos últimos, además de diversos elementos bactericidas que utilizan durante la fagocitosis. Los **eosinófilos** son fagocitos más débiles que los neutrófilos pero actúan degradando diversos parásitos (mediante el contenido de sus gránulos tales como histaminasa y peroxidasa) y funcionan como mediadores de la inflamación en procesos alérgicos (Manascero Gómez, 2003).

Las **células Auxiliares** están constituidas por basófilos. Los **basófilos** son los leucocitos menos abundantes de la sangre, poseen gránulos, los cuales contienen histaminas que causan vasodilatación, y heparina, que actúa como un anticoagulante. Juegan un rol importante en las reacciones alérgicas e inflamación (Tórtora y Derrickson, 2013, Welsch y Sobotta, 2008).

En la figura 1.4 se presentan los distintos tipos de leucocitos.

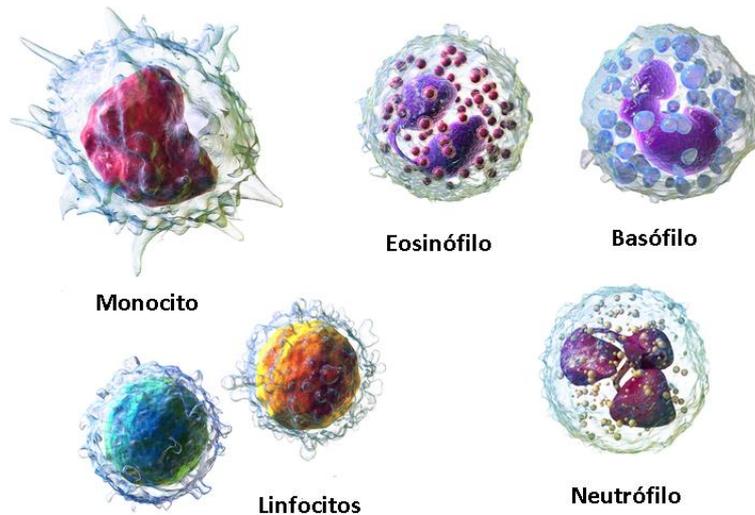


Figura 1.4: *Distintos tipos de leucocitos (adaptado de Blausen.com).*

A su vez, según la morfología del núcleo, los leucocitos se pueden clasificar en **mononucleares (MN)**, si el núcleo es esférico (monocitos y linfocitos), también llamados agranulocitos, ya que sólo poseen gránulos primarios que no se tiñen satisfactoriamente con los métodos de tinción clásicos, y **polimorfonucleares (PMN)**, si el núcleo es lobulado (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), también llamados granulocitos, debido a que poseen, además de los gránulos primarios, gránulos secundarios específicos que se tiñen selectivamente (Welsch y Sobotta, 2008).

La funcionalidad del sistema inmunitario está particularmente ligada a la liberación de radicales del oxígeno, ejerciendo las células inmunitarias su función defensiva de eliminación de patógenos y células extrañas mediante la utilización de ERO, por lo que los leucocitos son una fuente importante de agentes oxidantes (Vida y col., 2014).

A fin de liberar su batería de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, las células fagocíticas, estimuladas por complejos antígeno-anticuerpo, vierten el contenido de sus gránulos primarios y secundarios dentro del fagosoma; no obstante dichos gránulos y su contenido son diferentes en el caso de PMN y monocitos-macrófagos. Al mismo tiempo en estas células, se sintetizan RL o ERO (principalmente $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} y $HClO$), que actúan sobre bacterias, virus, hongos y micoplasmas. En relación a esto, además se ha descrito que uno de los posibles mecanismos por el cual los eosinófilos destruyen parásitos jóvenes es por producción de ERO (Guyton y Hall, 2006).

Los neutrófilos activados son capaces de generar un potente oxidante, $HClO$, por la acción de la enzima MPO (Página 10). Este potente oxidante colabora con la actividad microbicida del leucocito, pero además puede ser capaz de actuar sobre las células del huésped en caso de activación incontrolable o excesiva. En este sentido reacciona con los grupos $-SH$ y aminos proteicos, y es capaz de provocar entrecruzamientos entre proteínas, reaccionar con ácido grasos insaturados para formar cloraminas y clorar las bases púricas del ADN (García Morales y col., 1998). Los

monocitos también contienen MPO en sus gránulos primarios, sin embargo éstos son menos numerosos que en los neutrófilos (Klebanoff, 2005).

Además, las células fagocíticas del sistema inmune poseen una de las isoformas de la familia de enzimas NADPH oxidasa, la NOX 2, la cual frente a determinados estímulos reduce el O_2 a $O_2^{\cdot-}$, desencadenando así una cascada de formación de ERO. El $O_2^{\cdot-}$, el cual dada la orientación de la NOX puede ser producido ya sea en el espacio intraorganelar o extracelular, se metaboliza hacia H_2O_2 y puede seguir dos vías, la generación del radical HO^{\cdot} o la formación de varios productos tóxicos en presencia de haluros y de la MPO. Estas ERO generadas participan en la actividad destructora de microorganismos y células tumorales pero también pueden ejercer una actividad citotóxica en las células huésped normales (Babior y col., 2002; Klebanoff, 2005; Mytar y col., 1999; Paiva y Bozza, 2014). La reacción catalizada por la enzima NADPH oxidasa para la formación de ERO es:



Las células inmunitarias son, por otra parte, muy sensibles a la oxidación, debido al alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados presentes en sus membranas, al papel crítico de la señalización celular asociada a las mismas y a la expresión génica que requieren en su labor defensiva (Meydani y col., 1995). Si bien los leucocitos poseen defensas antioxidantes que los protegen del aumento de las ERO que generan, al liberarse estos compuestos al medio extracelular ó al ser producidos en exceso, pueden dañar al organismo hospedador así como a la célula que los produce. Por todo ello, los leucocitos son un claro ejemplo de la necesidad imperiosa de mantener el equilibrio oxidantes/antioxidantes en dichas células (Vida y col. 2014). Un claro ejemplo de ello, es la retención, a concentraciones milimolares, que producen los leucocitos MN sobre el ácido ascórbico, poderoso antioxidante, cuando este ingresa a la célula (Bergsten y col., 1990), el cual es consumido rápidamente cuando los fagocitos son activados y necesitan protegerse de los RL que producen (Frei, 1991). De hecho, se ha comprobado que los leucocitos, tanto fagocitos como linfocitos (los cuales, se ha demostrado que también generan ERO a través de un sistema de NADPH oxidasa), utilizan sus reservas de antioxidantes cuando tienen que llevar a cabo su trabajo defensivo, en el cual es necesaria la producción de compuestos oxidantes e inflamatorios, y además, pueden incorporar antioxidantes desde el medio en el que se encuentran (Bedard y Krause, 2007; Victor y col., 2001). Es decir que, aparte de su actividad microbicida, los leucocitos pueden producir injuria en el organismo mediante reacciones oxidativas e inflamatorias capaces de dañar el tejido, perturbando su integridad y funcionalidad. Los productos bactericidas de las células fagocítica pueden ser liberadas fuera del fagosoma hacia el citosol y hacia el micromambiente

extracelular y producir daño en los tejidos cuando las defensas antioxidantes se ven sobrepasadas (Forman y Torres, 2001; Kaneider y col., 2006; Weiss, 1989)

Es por todo lo antes mencionado que la regulación de la producción de ERO es trascendental en leucocitos y se considera a la leucotoxicidad como un aspecto importante entre las consecuencias tóxicas que pueden producir algunos fármacos, entre ellos, los antibióticos.

1.3 *Antibióticos y ERO: Gentamicina, Ciprofloxacina y Cloranfenicol*

Algunos efectos secundarios producidos por ciertos fármacos estarían relacionados a la capacidad que ellos tienen de incrementar el estrés oxidativo en diferentes órganos, tejidos y líneas celulares, produciendo daños que pueden repercutir en la salud. En general, los efectos citotóxicos de estos fármacos incluyen diversos cambios metabólicos que afectan el funcionamiento normal de las células huéspedes, con el estrés oxidativo como una de las alteraciones provocadas.

Existen numerosos trabajos que sugieren que las reacciones de RL estarían involucradas en los efectos tóxicos de diversos antibióticos sobre células eucariotas, tales como amoxicilina, dapsona, vancomicina, ampicilina, doxorubicina, isoniazida, rifampicina, ciprofloxacina, enrofloxacin, cloranfenicol y gentamicina (Albuquerque y col., 2015; Atili y col., 2016; Correa Salde, 2011; Ilgin y col., 2015; Keeney y col., 2015; Quin y Liu, 2013; Sankar y col., 2015). Específicamente en esta tesis nos centraremos en tres de ellos: **gentamicina, ciprofloxacina y cloranfenicol**.

Gentamicina

Gentamicina (GEN) es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, posee acción bactericida, actúa interviniendo en la síntesis proteica uniéndose irreversiblemente a una o más proteínas receptoras específicas de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, interfiriendo así con el complejo de iniciación entre el ARN mensajero y la subunidad 30S, dando lugar a la síntesis de proteínas no funcionales. Este antibiótico se ha utilizado por años para el tratamiento de numerosas infecciones tales como infecciones abdominales, cutáneas, óseas, meningitis bacteriana, septicemia, otitis, neumonía, entre otras. Si bien este antibiótico ha sido ampliamente utilizado en la práctica clínica durante décadas, debido a su gran toxicidad y a los múltiples efectos secundarios que presenta, actualmente su uso debe evitarse salvo que sea estrictamente necesario, es por ello, que sólo se utiliza en casos de resistencia bacteriana a los antibióticos de uso común, las cuales son cada vez más recurrentes, y en casos de infecciones graves y potencialmente mortales causadas principalmente por bacterias Gram-negativas aunque también se utiliza en bacterias Gram-positivas (Rang y col. 2000).

Los principales efectos secundarios que presenta son nefrotoxicidad y ototoxicidad, los cuales se presentan entre el 10 y 30 % de los pacientes, siendo en algunas situaciones tan severos que el tratamiento debe ser discontinuado (Abdelsameea y col., 2016; Denamur y col., 2011). Otros importantes efectos secundarios asociados a este antibiótico son neurotoxicidad, hepatotoxicidad, y además a nivel hematológico, se ha documentado, aunque en menor medida, la aparición de eosinofilia, leucopenia, granulocitopenia y trombocitopenia asociados al uso de este antibiótico (Sweetman, 2009). El mecanismo preciso de toxicidad inducida por GEN aún no ha sido totalmente elucidado, sin embargo, un gran número de estudios realizados principalmente en ratas sobre los tejidos específicos asociados a las principales patologías generadas (nefrotoxicidad, ototoxicidad y hepatotoxicidad) han sugerido que un incremento en la generación de ERO y Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN), incremento de peroxidación lipídica, depleción en las defensas antioxidantes, alteración en los niveles endógenos de antioxidantes de bajo peso molecular como bilirrubina y glutatión reducido (GSH), incremento en la actividad NADPH oxidasa y un incremento en la producción de citoquinas inflamatorias, jugarían un importante rol en estos efectos tóxicos (Ademiluyi y col., 2013; Chang y col., 2016; Fouad y col., 2014). Uno de los efectos secundarios más estudiados es la nefrotoxicidad, demostrándose que GEN incrementa la generación de ERO como $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} y H_2O_2 , y ERN en la corteza renal que eventualmente puede conducir al deterioro estructural y funcional, además de incrementar los niveles de lipoperoxidación y oxidación de proteínas, e inducir una deficiencia en las defensas antioxidantes endógenas SOD y CAT (Balakumar y col., 2010)

Si bien existe un estudio que reporta que GEN es capaz de generar alteraciones en el equilibrio oxidativo en sangre entera y eritrocitos (Correa Salde, 2011), no existen hasta el momento estudios realizados directamente en leucocitos humanos que evidencien si este antibiótico podría inducir toxicidad relacionada a la producción de estrés oxidativo en este importante grupo de células sanguíneas.

Ciprofloxacina

Las fluoroquinolonas son agentes antibacterianos extensamente utilizados para el tratamiento de infecciones con varios tipos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, presentan diversos efectos adversos tales como alteraciones gastrointestinales y del sistema nervioso central (SNC), reacciones de hipersensibilidad, tendinitis, exantema cutáneo (dermatitis) y fototoxicidad, en general con una incidencia de entre 5 y 20 %. En cuanto a la asociación de estos efectos indeseados con el estrés oxidativo, es conocido que estos antibióticos generan fototoxicidad tanto *in vitro*, en distintos tipos de células, como *in vivo*, la cual estaría asociada a un incremento de ERO tales como 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y HO^{\cdot} (Martínez y col., 1998; Ray y col., 2006).

Ciprofloxacina (CIP) es la fluoroquinolona utilizada con mayor frecuencia, cuya actividad antibacteriana se debe a su capacidad de inhibir la acción de la ADN girasa bacteriana (topoisomerasa II), enzima encargada de producir un superenrollamiento negativo de ADN y permitir la replicación del ADN bacteriano. Es un antibiótico de amplio espectro comúnmente utilizado en infecciones respiratorias, gastrointestinales, osteoarticulares e infecciones del tracto urinario. Específicamente sobre CIP se han realizado estudios en los cuales diferentes autores han investigado la participación de las ERO en la toxicidad inducida por este antibiótico, relacionando su fototoxicidad, hepatotoxicidad y sus efectos sobre el SNC y los tendones con una inducción de estrés oxidativo asociado con un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y HO^{\cdot} . Se ha evaluado la fototoxicidad en líneas celulares de fibroblastos y astrocitos de ratón demostrándose un incremento en la producción de 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y HO^{\cdot} dependiente de la concentración, con inducción de peroxidación lipídica y daño en el ADN, mientras que *in vivo* se observó un aumento de NO, peroxidación lipídica y alteraciones en el estatus redox de GSH con disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas en tejido hepático y cerebro de ratas (Abdel-Zaher y col., 2012; Agrawal y col., 2007; Gürbay y col., 2007).

En cuanto a sus efectos evaluados sobre células humanas, hay reportes de estudios sobre su citotoxicidad en fibroblastos humanos, en ausencia de irradiación, en los cuales se observó una inhibición de la proliferación celular normal con aumento de peroxidación lipídica y disminución de la actividad de la enzima antioxidante endógena CAT (Hincal y col., 2003). Particularmente sobre células sanguíneas humanas, se ha demostrado que CIP es capaz de inducir en fagocitos la producción de $O_2^{\cdot-}$ tras ser irradiado con luz UV (Saniabadi y col., 1996), y en neutrófilos genera un aumento en la producción de ERO en ausencia de irradiación (Becerra y col., 2003). Por otra parte, estudios sobre eritrocitos demostraron que este antibiótico causa estrés oxidativo sobre estas células, generando depleción en los niveles de GSH (antioxidante no enzimático) y cambios conformacionales y funcionales en la enzima CAT generando una inhibición de su actividad (Quin y Liu, 2013). Por último, un estudio realizado sobre pacientes tratados con CIP demostró un aumento de estrés oxidativo en plasma luego de 5 días de tratamiento, manifestándose una elevación significativa y gradual de los niveles de peróxidos de lípidos y disminución en los niveles de la enzima antioxidante SOD, de GSH y del status antioxidante en plasma, el cual es considerado extremadamente significativo con respecto a los niveles iniciales antes de comenzar la terapia (Talla y Veerareddy, 2011).

Cloranfenicol

El tercer antibiótico de interés para esta tesis es cloranfenicol (CMP), en este caso se trata de un antibacteriano de tipo bacteriostático perteneciente al grupo de los anfenicoles, que puede ser eventualmente bactericida frente a bacterias causantes de

meningitis. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica, debido a su capacidad de unirse a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, evitando la transferencia de aminoácidos de las cadenas peptídicas en formación por supresión de la peptidiltransferasa, inhibiendo de este modo la formación del enlace peptídico y la síntesis de proteína subsiguiente. Es un antibiótico de amplio espectro, utilizado contra microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos y rickettsias para el tratamiento de meningitis, septicemias bacterianas, fiebre tifoidea, infecciones abdominales, óseas, otitis, neumonía y sinusitis. Los efectos adversos de este fármaco son generalmente transitorios, pero en algunos casos pueden ser muy importantes. Los efectos secundarios más importantes aunque poco frecuentes son de origen alérgico, mientras que los más frecuentes son aquellos que afectan el sistema hematopoyético, entre ellos se encuentran anemia, trombocitopenia, granulocitopenia, anemia aplásica y alteraciones inmunológicas. En muchos pacientes que reciben CMP durante 2 o más semanas aparecen alteraciones celulares sanguíneas, que desaparecen cuando el tratamiento se interrumpe. Es por ello que, si bien se trata de un antibiótico de bajo costo y de gran efectividad, su importante toxicidad provoca que no sea un antibiótico de primera elección, que no se recomiende su empleo en tratamientos de infecciones leves que puedan ser tratadas fácilmente con otros antibióticos menos tóxicos y por lo tanto que su uso se vea disminuido de manera constante en los últimos 50 años (OMS, 2014; Rang y col., 2000; Sweetman, 2009).

La relación entre el estrés oxidativo y sus efectos secundarios ha sido estudiada. Las principales manifestaciones tóxicas de CMP se han atribuido al ataque de los RL y al agotamiento de antioxidantes celulares, a su vez, se ha demostrado que este último puede ser un factor importante en el aumento de la vulnerabilidad de un individuo a la toxicidad de dicho antibiótico. La anemia aplásica idiosincrática puede ocurrir en pacientes con predisposición a dicha enfermedad al ser tratados con CMP, independientemente de la dosis, debido a la producción de un derivado de nitro-reducción que puede causar daño en el ADN durante la replicación en células madre hematopoyéticas, resultando en una hipocelularidad ósea y progresiva pancitopenia (Laporte y col., 1998). Por otra parte, este antibiótico es capaz de alterar la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT y GPx), disminuir los niveles de antioxidantes no enzimáticos en suero, inducir peroxidación lipídica con aumento de hidroperóxidos lipídicos y producir RL capaces de alterar las enzimas del complejo CYP, en fracción microsomal hepática de rata (Farombi y col., 2002). En queratinocitos humanos, CMP induce apoptosis la cual se asociaría con la activación de caspasas e incremento en la producción de ERO; este efecto se relacionaría con la hipersensibilidad en la piel que genera este antibiótico al ser administrado en forma tópica (Popadic y col., 2006). En hepatocitos de rata, CMP genera citotoxicidad con generación de ERO inductoras de estrés oxidativo que podría estar íntimamente relacionado con una alteración morfológica conocida como megamitocondria (Karbowski y col., 1999).

Debido a que los principales efectos secundarios de este antibiótico son a nivel de circulación periférica, existen muchos estudios realizados en células sanguíneas humanas y sistema hematopoyético. Se ha visto que dosis sub-terapéuticas de CMP inducen apoptosis en células madre hematopoyéticas humanas tanto *in vitro* como *in vivo*, la cual estaría relacionada a eventos metabólicos que involucran el ataque de RL que conduce a una depleción de antioxidantes celulares (Holt y col., 1997). Además, se ha demostrado que las células sanguíneas, tanto leucocitos como eritrocitos, sufren estrés oxidativo en presencia de CMP con un incremento significativo de ERO y ERN (Eraso y Albesa, 2007). En sangre entera, CMP induce estrés oxidativo produciendo un aumento en los niveles de ERO, oxidación de proteínas (observándose un incremento en los niveles de residuos carbonilo y productos avanzados de oxidación proteica utilizados como biomarcadores de estrés oxidativo), oxidación de hemoglobina y disminución del potencial antioxidante en plasma (Correa Salde y Albesa, 2009). Además particularmente en leucocitos humanos (neutrófilos), CMP induce una alteración en la producción de ERO y particularmente de $O_2^{\cdot-}$ tanto intra como extracelular, demostrando un respuesta bifásica dependiente de la dosis, en la cual a dosis bajas del antibiótico se observa un aumento importante de especies reactivas mientras que dosis demasiado tóxicas provocan una disminución en la producción de las mismas. Un comportamiento similar se observa en la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas (SOD y CAT) y en los niveles de GSH ya que a bajas concentraciones de CMP, la actividad/nivel de estas defensas se ve aumentada, mientras que a concentraciones altas del antibiótico las mismas se ven disminuidas (Páez y col., 2008).

Las reacciones adversas de fármacos que afectan el equilibrio redox y aumentan las ERO constituyen un importante desafío para el uso seguro de medicamentos. Dada por un lado la toxicidad conocida de **GEN** en distintos órganos y a su vez, la falta de estudios relacionados a su toxicidad a nivel periférico y por el otro, el amplio uso clínico que posee **CIP**, cuya leucotoxicidad ya ha sido demostrada, es necesario trabajar sobre el mejoramiento de la terapia con dichos antibióticos. Otros factores fundamentales a tener en cuenta para el éxito de un tratamiento son la eficacia y el costo del mismo. En este punto **CMP** es un antibiótico económico, eficaz y con muy baja frecuencia de resistencia bacteriana, razón por la cual pese a los efectos adversos que presenta, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aboga por su uso en países no industrializados en los cuales se dificulta la disponibilidad de antibióticos más costosos, lo que genera la necesidad de un renovado interés en la toxicología de este medicamento.

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. La presión selectiva ejercida por el uso, mal uso y uso excesivo de fármacos antibacterianos ha planteado el problema de las bacterias resistentes a los antibióticos,

que han adquirido la capacidad de sobrevivir a los fármacos existentes a concentraciones clínicamente relevantes produciendo enfermedades muy graves. Por lo tanto, la creciente resistencia a los antibióticos es un elemento primordial que pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias. Según la OMS, cada año, 480.000 personas presentan infecciones bacterianas multirresistentes y sumado al riesgo que esta situación supone en la salud del paciente, la prolongación de la enfermedad, la necesidad de más pruebas y la utilización de fármacos más caros, aumentan el costo de la atención sanitaria a dichos pacientes, por lo que la resistencia a los antibióticos supone una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial y requiere medidas por parte de todos los sectores involucrados. La propagación a nivel mundial de nuevos mecanismos de resistencia pone en peligro nuestra capacidad de tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la prolongación de la enfermedad, discapacidad y muerte. Los datos son muy preocupantes y demuestran la existencia de resistencia a los antibióticos, especialmente a los utilizados como «último recurso», en todas las regiones del mundo (OMS, 2016).

Una de las medidas que se deben fortalecer en la lucha contra la resistencia a los antibióticos es mejorar la seguridad de antibióticos de uso frecuente con una tasa creciente de resistencia bacteriana, como es el caso de **CIP**, de modo tal que ello posibilite un aumento en las concentraciones terapéuticas. Mientras que otra estrategia importante es la recuperación de aquellos antiguos medicamentos cuyo uso clínico haya disminuido o sea limitado debido a los efectos secundarios tóxicos y/o a los reportes de la resistencia frecuente, por lo cual cobra especial interés la posibilidad de recuperar antibióticos como **CMP** y **GEN** dada la importante toxicidad que éstos presentan.

1.4 Estrategias celulares contra las Especies Reactivas del Oxígeno. Defensas Antioxidantes.

Si bien, como ya hemos visto, los organismos están expuestos a la producción de ERO capaces de generar daño en las células y por ende a los distintos tejidos, los seres vivos han desarrollado distintos mecanismos antioxidantes con el fin de defenderse de estas especies tóxicas.

“Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que, a concentraciones relativamente bajas, retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana” (Halliwell, 2007). Los antioxidantes al interactuar con un RL le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose luego en un RL débil no tóxico; debido a que interactúan más rápido con los RL que con el resto de las moléculas presentes, impiden así que otras moléculas se unan al O₂. De esta manera, los antioxidantes protegen a los sistemas biológicos frente a los efectos perniciosos de

las reacciones que causan oxidaciones excesivas. Las defensas antioxidantes no son homogéneas, varían según el tejido, atendiendo al tipo de célula que lo constituye, estado fisiológico o requerimientos especiales. Ejercen su acción tanto en medios hidrofóbicos como hidrofílicos, alterando su propia integridad molecular en pos de evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales (Kohen y Nyska, 2002).

El organismo dispone de un sistema endógeno (que a su vez se puede clasificar en enzimático y no enzimático) y un sistema exógeno cuyos componentes actúan como moléculas suicidas, por lo que su reposición debe ser continua a través de la dieta. Seguidamente se hará mención a los más estudiados y especialmente a los que son objeto de la presente tesis doctoral.

1.4.1 *Antioxidantes endógenos*

Los **Antioxidantes Endógenos Enzimáticos** constituyen la primera línea de defensa y previenen el daño oxidativo interaccionando directamente con las ERO. Reaccionan con las diversas especies reactivas, actúan como catalizadores, solo se necesita que estén presentes en pequeñas cantidades para que ejerzan su protección y son reciclados eficientemente después de su actuación (Boots y col, 2008). Entre ellos se pueden destacar:

↪ **Superóxido Dismutasa**

Metaloenzima descubierta en 1969 en eritrocitos, es una de las primeras líneas de defensa enzimática capaz de eliminar eficientemente al $O_2^{\cdot-}$, transformándolo en H_2O_2 y O_2 . Existen varias formas moleculares de esta enzima, en mamíferos los tipos intracelulares son: la Cu-ZnSOD, localizada en el citosol, la cual se asocia con Cu y Zn y juega un rol crucial en la defensa contra el $O_2^{\cdot-}$ generado por células fagocíticas y la Mn-SOD, que posee en su centro activo Mn y se localiza en las mitocondrias. Al generar H_2O_2 como producto, su acción debe ser complementada con otros antioxidantes como CAT y GPx capaces de eliminar dicho producto (Kehrer y col, 2015; Kohen y Nyska, 2002).



↪ **Catalasa**

Esta enzima está presente en casi todas las células aeróbicas siendo especialmente abundante en los eritrocitos y las células hepáticas. Principalmente se encuentra en peroxisomas, dado a su efectividad de degradar altas concentraciones de H_2O_2 , pero también, en menor abundancia en mitocondrias y en el citosol. Contiene un resto hemo en su sitio activo y su función principal es disminuir o anular la formación del radical HO^{\cdot} a partir del H_2O_2 , cuya reducción cataliza, impidiendo así su utilización

en la reacción de Fenton. Por un lado, cataliza la reducción de peróxido en agua, y por otro lado oxida los donantes de grupos de hidrógeno, como el metanol y el etanol, por lo que esta enzima presenta actividad catalítica y peroxidativa (Halliwell y Gutteridge, 1999; Kehrer y col, 2015; Vida y col., 2014)



↻ Glutación Peroxidasa/ Glutación Reductasa

Glutación Peroxidasa (GPx) es una enzima dependiente de selenio, presente en todos los tejidos, que cataliza la reducción de H_2O_2 y lipoperóxidos, utilizando GSH como sustrato reductor. Se localiza principalmente en el citosol, siendo más efectiva en la degradación de bajas concentraciones de H_2O_2 . El glutatión disulfuro oxidado que se genera (GSSG) puede ser reducido a GSH por acción de la enzima Glutación Reductasa (GR), flavoproteína dependiente de NADPH, logrando así mantener elevada la relación GSH/GSSG en las células normales, impidiendo que se alcancen niveles de GSSG que podrían resultar muy tóxicos para las mismas y evitando que se agoten las reservas de GSH (Deponete, 2013; Kehrer y col, 2015; Kohen y Nyska, 2002).



En líneas generales la acción conjunta de las principales defensas antioxidantes endógenas de tipo enzimático, con el fin de proteger al organismo contra las principales ERO, se puede resumir en la figura 1.5.

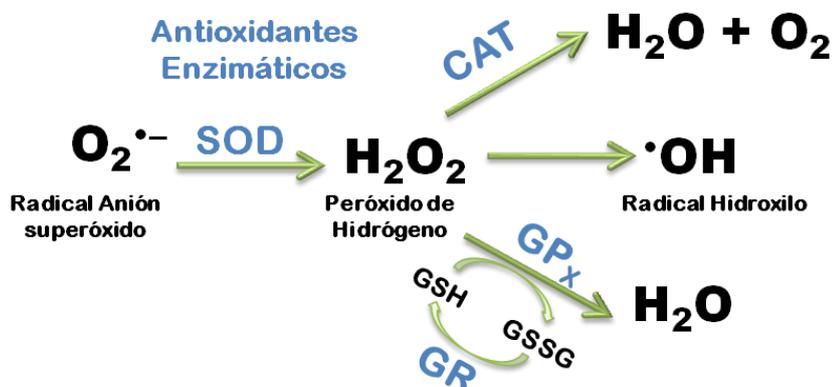


Figura 1.5: Reacciones catalizadas por las principales enzimas antioxidantes endógenas.

El sistema **Antioxidante Endógeno No Enzimático**, constituye la segunda línea de defensa y está formado básicamente por antioxidantes de bajo peso molecular que forman un numeroso conjunto de compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por interacción directa o indirecta con las ERO, de la misma forma que lo hacen los antioxidantes exógenos (Boots y col, 2008).

El mecanismo de acción indirecto implica principalmente la quelación de metales de transición para evitar su participación en reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss (Página 9). Entre los compuestos que actúan por esta vía encontramos proteínas como la ceruloplasmina, la transferrina y la lactoferrina, la haptoglobina y la albúmina.

Las moléculas que actúan en forma directa sobre las especies reactivas lo hacen por medio de la transferencia de electrones o por medio del secuestro de RL evitando así que ataquen las moléculas diana. Además, suelen tener también capacidad de quelación de metales (actividad indirecta). Por su pequeño tamaño, pueden atravesar las membranas celulares y localizarse cerca de las posibles dianas biológicas; además, la propia célula puede regenerarlas y regular sus concentraciones. Estas moléculas, aunque normalmente funcionan como antioxidantes, desarrollan otras funciones biológicas en la célula. Entre estas moléculas destacan, compuestos como bilirrubina, tioprolina, ácido úrico, ácido lipoico, histidina, melatonina, N-acetilcisteína, glucosa, coenzima Q10 y GSH (Kohen y Nyska, 2002; Vertuani y col., 2004).

Uno de los antioxidantes más importantes es el **GSH**, que puede encontrarse en dos formas diferentes según su estado de óxido-reducción: como glutatión reducido, o como glutatión oxidado. El GSH está implicado en múltiples funciones, es cofactor de un gran número de enzimas, participa en la síntesis y conformación de proteínas, protege a la célula contra los RL ya que es capaz de interactuar directamente con ERO como $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , ROO^{\cdot} , RO^{\cdot} y $HClO$, e interviene en múltiples procesos celulares como la diferenciación, la proliferación celular y la apoptosis. Como ya se mencionó anteriormente, la enzima GR juega un papel fundamental en el mantenimiento de niveles adecuados de GSH lo cual es fundamental para preservar la integridad celular (Ballatori y col., 2009; Kalinina y col., 2014). Otros antioxidantes endógenos que podemos mencionar son: la **tioprolina** el cual es un aminoácido sulfúrico cíclico, un metabolito natural de origen hepático que actúa como antioxidante secuestrando RL; la hormona **melatonina**, capaz de atrapar una gran variedad de ERO, probablemente a través de la donación de un átomo de hidrógeno del grupo $-NH$, y alterar indirectamente la actividad antioxidante de la célula mediante la estimulación de la síntesis de enzimas antioxidantes y modulando la secreción y acumulación de otros antioxidantes; la **bilirrubina** capaz de captar ROO^{\cdot} y prevenir así la peroxidación de las membranas lipídicas y el **ácido úrico**, efectivo captador de 1O_2 y RL como ROO^{\cdot} y HO^{\cdot} (Pisoschi y Pop, 2015), entre otros.

1.4.2 Antioxidantes exógenos

Las principales clases de compuestos dentro del grupo de los antioxidantes exógenos que pueden ser incorporados al organismo son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos).

🌀 Vitaminas

Dentro del conjunto de vitaminas que contribuyen al metabolismo celular, se encuentran algunas que son importantes para el equilibrio redox en las células. Un ejemplo es la **vitamina E**, la cual engloba distintas formas de tocoferoles liposolubles, cuya acción antioxidante reside en su capacidad para neutralizar los radicales $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} y lipoperoxilo a formas menos nocivas. A su vez, tiene la capacidad de reaccionar más rápidamente con los ROO^{\bullet} que los ácidos grasos poliinsaturados, frenando de este modo la reacción en cadena de lipoperoxidación que ocurre en el daño oxidativo a las membranas. La neutralización de un radical, llevada a cabo por la vitamina E, provoca la formación del radical vitamina E, disminuyendo así su contenido celular, sin embargo, el radical vitamina E es reciclado a vitamina E a costa de diversos antioxidantes como GSH o vitamina C (Kurutas, 2016).

Otra de las vitaminas de importancia es la **vitamina C**, uno de los antioxidantes hidrofílicos más importantes, siendo efectivo como scavenger de $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , H_2O_2 , 1O_2 y ERN. A nivel estructural, la vitamina C posee 4 grupos OH que pueden donar hidrógeno a un sistema oxidante, y el radical semidehidroascorbato formado, tras la pérdida de un electrón, puede resonar en la estructura haciéndose mucho más estable, y por lo tanto mucho menos reactivo, que la mayoría de los RL (Oroian y Escriche, 2015).

🌀 Polifenoles

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas que abarcan desde la protección frente a influencia extremas hasta el olor, color y polinización, además son uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras polifenólicas conocidas (Dreosti, 2000). Presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares y comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como las ligninas. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un RL y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Shahidi y Ambigaipalan, 2015). Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente Fe y Cu) y por tanto para inhibir la formación de RL a través de reacciones de Fenton, además pueden ejercer un efecto

antioxidante indirecto, mediante la activación de las enzimas antioxidantes endógenas del cuerpo (Oroian y Escriche, 2015; Rice-Evans y col., 1997). En la última parte del siglo 20, el interés por los compuestos fenólicos se ha incrementado debido tanto a sus propiedades antioxidantes y capacidad secuestrante de RL, como las diversas actividades biológicas beneficiosas para la salud que se les atribuyen. Entre estas se destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos, o inhibidores de la agregación plaquetaria y de enzimas prooxidantes, como ciclooxigenasa, lipooxigenasa y xantina oxidasa (Halliwell y Gutteridge, 1999; Hou y col., 2004; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Dentro del amplio grupo de polifenoles existentes, nos centraremos en el grupo de interés para esta tesis doctoral: los **flavonoides**.

1.5 Flavonoides: Características y Actividad Antioxidante.

El conocimiento de las plantas medicinales nativas resulta de gran beneficio, pues puede permitir enriquecer el número de drogas medicinales útiles al hombre, por lo cual, el interés del ser humano por conocer dichas especies vegetales data de tiempos muy remotos.

Como ya se mencionó anteriormente, en la naturaleza podemos encontrar un amplio grupo de metabolitos secundarios de especies vegetales: los **fenoles**, y dentro de ellos encontramos a los **flavonoides**, los cuales constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. Estos metabolitos fenólicos son sintetizados por las plantas durante su crecimiento y desarrollo, y sobre ellos se han centrado expectativas por las variadas actividades que han informado, entre ellas actividad antioxidantes y capacidad secuestrante o scavenger de RL.

Químicamente son fenoles del tipo diaril-propano (Ar-C3-Ar) unidos la mayoría a una cadena de azúcares. Su estructura básica consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) (Figura 1.6) (Manach y col., 2004).

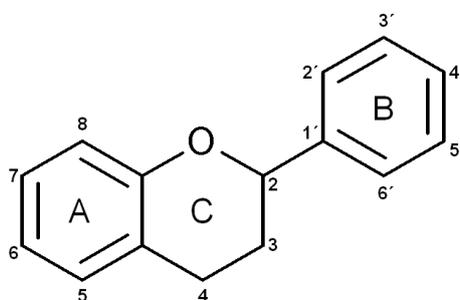


Figura 1.6: Estructura básica de los flavonoides (adaptada de Kurutas, 2016).

En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos (Figura 1.7) (Manach y col., 2004; Villar del Fresno, 1999).

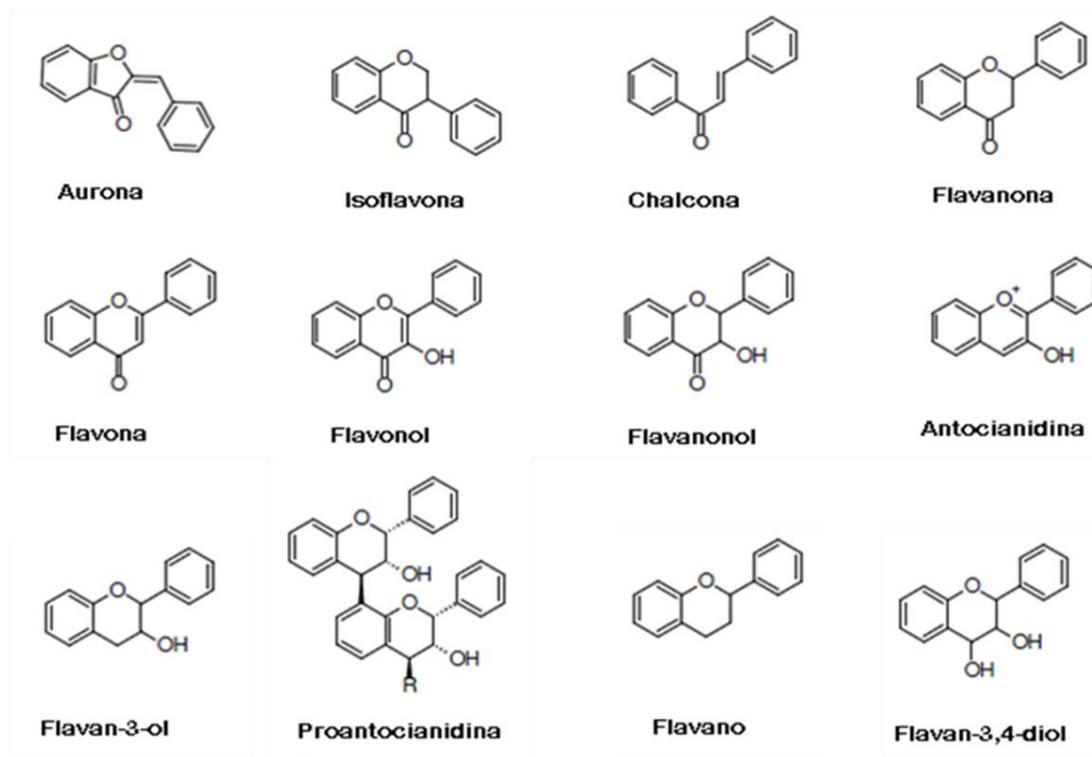


Figura 1.7: Principales tipos de flavonoides.

La estructura base puede tener grupos hidroxilos, cuyas posiciones más frecuentes son 3, 5, 7, 3', 4', los cuales a su vez pueden estar libres, eterificados con metanol o unidos a distintos azúcares, generalmente como C-heterósidos u O-heterósidos. Las moléculas de flavonoide no unidas a un grupo glúcido se conocen como agliconas, mientras que las formas glicosiladas se denominan glicósidos de flavonoide y son las más frecuentes en las plantas. Se han identificado más de 80 azúcares diferentes unidos a los flavonoides; monosacáridos, disacáridos, trisacáridos e incluso tetrasacáridos. Los azúcares más comunes son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico (Hollman y Arts, 2000; Manach y col, 2004; Villar del Fresno, 1999).

Los flavonoides se encuentran extendidos en el reino vegetal como pigmentos que le dan color a las flores y algunos frutos, pero también se los encuentra en alimentos de consumo cotidiano como frutas, verduras, nueces, infusiones y vinos. El papel exacto de estos metabolitos secundarios en las plantas todavía no está claro, pero se sabe que los flavonoides son importantes para la supervivencia de una planta en su entorno; regulan el crecimiento de las plantas, matan o inhiben el crecimiento de muchas cepas bacterianas, inhiben las principales enzimas virales, y destruyen algunos protozoos patógenos. Asimismo, actúan como atractores visuales, como repelentes,

fotorreceptores, y como protección contra la radiación UV. Desde el punto de vista farmacológico, estos poseen propiedades como antioxidantes, antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, presentan efecto protector vascular, gastroprotector, anticarcinogénico, neuroprotector, entre otras actividades (Amić y col, 2007; Procházková y col., 2011). En los últimos años han ido adquiriendo un gran interés en su estudio debido a su poder antioxidante, o sea su capacidad de reducir RL y quelar metales, no permitiendo la capacidad catalizadora de los RL, y por ende a su posible rol en la prevención de diversas enfermedades.

1.5.1 *Actividad antioxidante de flavonoides*

Los flavonoides pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales: capacidad captadora de RL y quelación de metales, sin embargo otros mecanismos que determinan su capacidad antioxidante son la inhibición de enzimas involucradas en la formación de RL, la activación de enzimas antioxidantes, y la regeneración de antioxidantes endógenos. En general, los flavonoides son antioxidantes en virtud del número y posición de sus grupos hidroxilos fenólicos unidos a las estructuras del anillo, por lo que la glicosilación de estos grupos reduce la capacidad antioxidante en comparación con los aglicones correspondientes, sin embargo existen otras características estructurales particulares que deben cumplir (Amić y col, 2007; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Como captadores o scavengers de radicales libres

Estos compuestos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos RL, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados dichos radicales. Para que un flavonoide antioxidante (FOH) tenga actividad antirradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) luego de reaccionar con la especie radical (R^\bullet). Esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria. Como resultado se formará un radical fenoxilo derivado del flavonoide (FO^\bullet) que es menos reactivo ya que se estabiliza por resonancia con los electrones π del anillo aromático (Figura 1.8), y puede ser recuperado gracias a la colaboración de otras moléculas antioxidantes como la vitamina C. Además, en el caso de los radicales aroxilo generados a partir de 3',4'-diOH flavonoides, éstos pueden reaccionar con un segundo radical (R^\bullet) adquiriendo una estructura de quinona estable (Amić y col., 2007; Halliwell, 2007; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

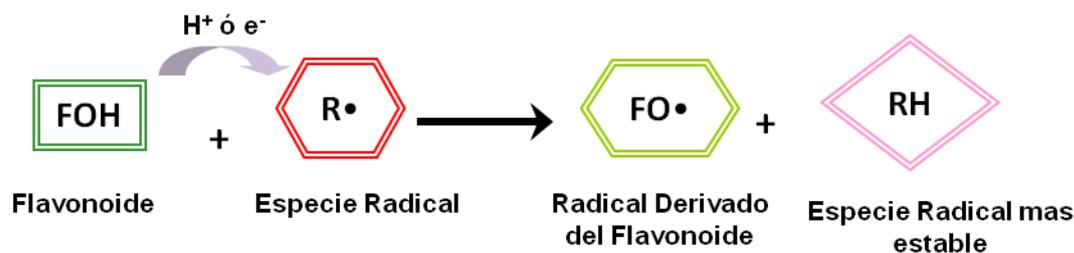


Figura 1.8: Esquema general del mecanismo captador o scavenger de RL.

Así, las características estructurales que determinan la capacidad de los flavonoides para captar radicales son (Figura 1.9) (Amić y col., 2007; Procházková y col., 2011; Shahidi y Ambigaipalan, 2015):

- * La presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto (3', 4') en el anillo B, que donan un hidrógeno/electrón para estabilizar la especie de radical.
- * La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo.
- * La presencia en el anillo del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y, junto con el grupo 4-ceto. Estas estructuras son importantes para la deslocalización de electrones y estabilización del radical fenoxilo, siempre que además estén presentes los dos orto-hidroxilos en el anillo B.

Esto hace que flavonas y, sobre todo, flavonoles se muestren como los más activos; sin embargo, otros flavonoides que no cumplen estos requisitos (derivados del flavano) también poseen actividad antirradicalaria.

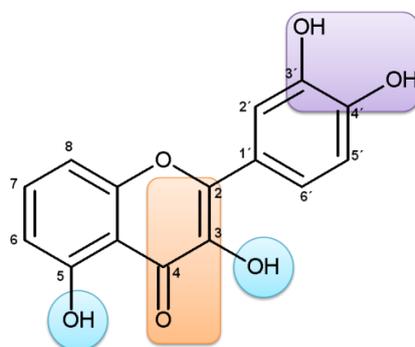


Figura 1.9: Principales requerimientos estructurales para actividad antioxidante. En violeta, hidroxilos en posición orto del anillo B. En naranja, el grupo 4-ceto conjugado con el doble enlace C2-C3. En celeste, grupos hidroxilo.

🌀 Como quelantes de metales

Los flavonoides también pueden actuar como quelantes de metales Cu^{2+} y Fe^{2+} (Figura 1.10). Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de RL por la reacción de Fenton.

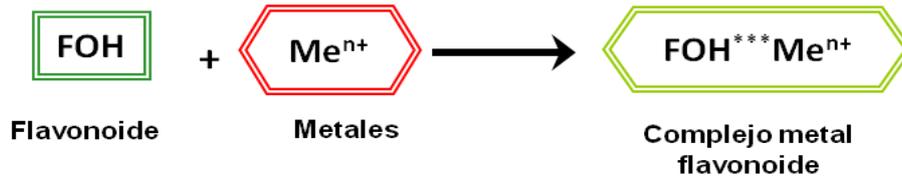


Figura 1.10: Esquema general del mecanismo de quelación de metales.

Generalmente, los siguientes grupos funcionales se consideran importantes para la actividad quelante de metales (Figura 1.11) (Amić y col., 2007; Procházková y col., 2011; Shahidi y Ambigaipalan, 2015):

- * La presencia de grupos hidroxilo en posición orto (e.j. 3'-4' o 7-8).
- * El grupo 4-ceto combinado con el hidroxilo en posición 3 o con el hidroxilo en posición 5, son sitios de acomplejamiento con metales

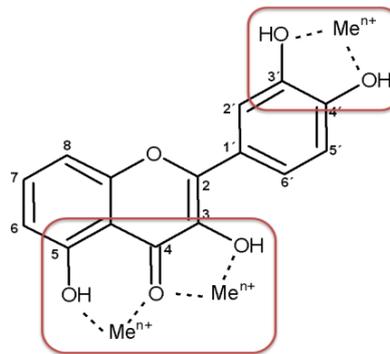


Figura 1.11: Principales sitios de unión de metales (adaptado de Amić y col., 2007).

Los flavonoides participan, por un lado, en funciones básicas para el correcto funcionamiento del organismo, pero a la vez pueden actuar como agentes oxidantes dañando diversas estructuras celulares. Los mecanismos en los que se basa este efecto son la formación de un complejo flavonoide hierro redox lábil, o de un radical fenoxilo lábil que por autooxidación, en presencia de altos niveles de metales de transición, puede generar $O_2^{\bullet-}$, y formas quinonas inestables, las cuales a su vez, pueden conjugarse con cisteína o ácidos nucleicos generando efectos prooxidantes. Otros mecanismos involucrados son la oxidación de antioxidantes de bajo peso molecular o daño directo en el ADN. El carácter antioxidante o prooxidante viene determinado por la estabilidad redox del radical formado a partir del flavonoide original, la concentración y estructura del flavonoide, y las condiciones fisiopatológicas del organismo. Si bien se cree que la actividad prooxidante es directamente proporcional al número total de grupos hidroxilo en la molécula del flavonoide, requerimiento estructural similar al necesario para poseer actividad antioxidante, en general se necesitan grandes concentraciones del flavonoide para observar efectos prooxidantes y si bien diversos estudios indican que los polifenoles pueden tener efectos tóxicos, es mucho más amplia la bibliografía que hace referencia a su capacidad

como antioxidantes y su participación en el mantenimiento de una buena salud. De cualquier forma, es necesario evaluar cada situación en particular para determinar el efecto predominante (Procházková y col., 2011; Saeidnia y Abdollahi, 2013).

Dado que la principal fuente de flavonoides es el reino vegetal, se presentarán los antecedentes de las especies vegetales con las que se trabajó en el presente trabajo de tesis.

1.6 Antecedentes de Especies Vegetales abordadas en el presente estudio

1.6.1 Género Flaveria Juss.

Flaveria Juss. es un género vegetal descrito por primera vez por Antoine Laurent de Jussieu en 1789 (Jussieu, 1789), su nombre proviene del latín flavus: dorado o amarillo y pertenece a la familia de las Asteráceas. Es un género esencialmente americano compuesto por 21 especies, la mayoría de ellas nativas del hemisferio norte. En nuestro país existen sólo dos representantes de este género, las cuales se encuentran profusamente distribuidas, *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze y *Flaveria haumanii* Dim. & Orf.

1.6.1.1 Antecedentes de la especie Flaveria bidentis (L.) Kuntze

Hábitat, características botánicas y usos medicinales

Flaveria bidentis (L.) Kuntze, es una especie vegetal ampliamente distribuida en todo el continente americano, su hábitat comprende desde el sur de EE.U.U hasta el centro de nuestro país (norte, centro, hasta Río Negro), creciendo espontáneamente a la vera de los caminos, en baldíos y suelos removidos, además suele invadir cultivos de maíz, alfalfa, tabaco etc., razón por la cual es considerada una maleza. Prefiere suelos bajos, húmedos o secos, arcillosos-arenosos, incluyendo salitrosos. Por lo vistoso de su follaje de un verde lustroso y hermosos capítulos florales amarillo oro, se la encuentra en jardines como planta ornamental.

Se trata de una hierba anual, erecta de 40-90 cm de altura, glabra, con tallos hojosos hasta el ápice, estriados, ramificados dicotómicamente. Hojas opuestas, subpecioladas, lanceoladas o elípticas, trinervadas desde la base, de 6-8 cm de largo por hasta 3 cm de ancho, agudas en el ápice, atenuadas en la base, de margen aserrado. Flores amarillas, dimorfas, tubulosas y pentalobuladas, reunidas en capítulos sésiles densos y cortos, agrupados en cimas terminales y axilares compactas, superadas por las ramificaciones; involucreo cilíndrico de 4 mm de alto por 1 mm de diámetro, tres brácteas, oblongas u oblongolanceoladas, trinervadas; aquenios oblongos, negros, 8-10 costados, sin papus, de 2,3-3 mm de largo (Figura 1.12). La planta vegeta en

primavera y florece y fructifica en verano y otoño (Barboza y col., 2006; Lamberto y col., 1997).



Figura 1.12: *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze
(adaptado de Tolosa, 2012)

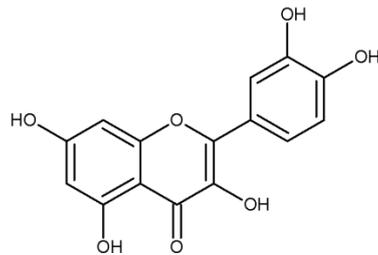
En nuestro país se la conoce con los nombres vulgares de “fique” o “fisque”, “contrayerba”, “chasca”, “balda”, “mata gusanos”. Los aborígenes utilizaban la infusión de sus hojas para curar las heridas producidas por mordeduras de víboras y arañas, empleando además emplastos de ellas para las heridas infectadas. Además era utilizada como tintura de lana debido al color amarillo de sus pigmentos (Zhang y col., 2007). Popularmente sus partes aéreas se emplean como antiparasitario, antitusígeno, expectorante, estimulante digestivo, emenagogo, la decocción de sus hojas es utilizada para tratar estados febriles, además se emplea como vermífugo,

antiséptico e insecticida de uso externo (Soraru y Bandobi, 1978; Barboza y col., 2006).

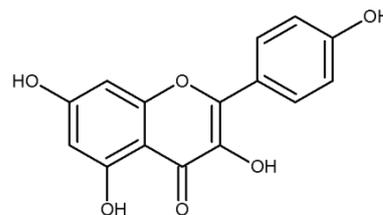
🔗 Estudios fitoquímicos en hojas: Flavonoides

En cuanto a los estudios fitoquímicos sobre hojas de esta especie, entre sus constituyentes químicos encontramos aminoácidos, aceite esencial, alcaloides, triterpenoides, flavonoides, derivados tiofénicos y taninos (Palacios Vaccaro, 1997).

Teniendo en cuenta el grupo químico de interés para esta tesis, en nuestro grupo de investigación han sido aislados 2 flavonoles aglicones: Quercetina (Q) y Kaempferol (Figura 1.13); un glicósido de quercetina: 3-glucósido de quercetina; y un grupo importante de flavonoides sulfatados derivados de quercetina como los constituyentes principales del extracto polar de sus hojas (Suárez y col., 1979).



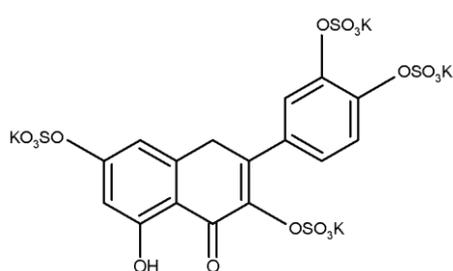
Quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiflavona)



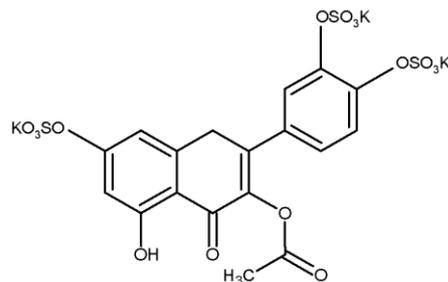
Kaempferol (3, 4', 5, 7-tetrahidroxiflavona)

Figura 1.13: Flavonoides aglicones aislados de hojas de *F. bidentis*.

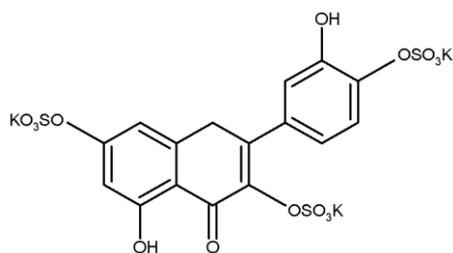
Los flavonoides sulfatados derivados de quercetina comprenden: 3,3',4',7 tetrasulfato de quercetina (Pereyra de Santiago y Juliani, 1972), 3-acetil-7-3',4' trisulfato de quercetina (Cabrera y Juliani, 1976), 3,7,3'-trisulfato de quercetina (Cabrera y Juliani, 1985), 3,7,4'-trisulfato de quercetina, 3,4'-disulfato de quercetina (Cabrera y Juliani, 1979) y 3-sulfato de quercetina (Figura 1.14) (Agnese y col., 1999). De ellos los que se encuentran en mayor proporción son el 3,3',4',7 tetrasulfato de quercetina (**QTS**) y el 3-acetil-7-3',4' trisulfato de quercetina (**ATS**).



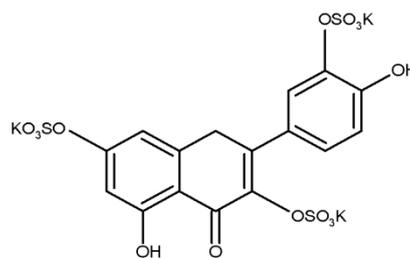
3,3',4',7 tetrasulfato de quercetina (QTS)



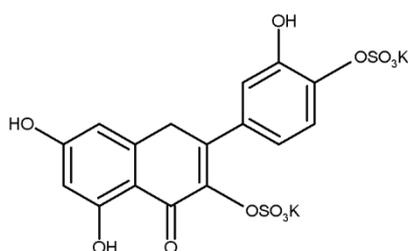
3-acetil-7-3',4' trisulfato de quercetina (ATS)



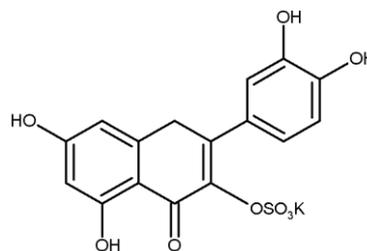
3,7,4'-trisulfato de quercetina



3,7,3'-trisulfato de quercetina



3,4'-disulfato de quercetina



3-sulfato de quercetina

Figura 1.14: Flavonoides sulfatados derivados de quercetina aislados de *F.bidentis*

🔗 Estudios de Actividad Biológica: Flavonoides Q, ATS y QTS

Los estudios realizados sobre actividad biológica de estos compuestos en nuestro grupo de investigación demostraron un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la enzima aldosareductasa, involucrada en los procesos de formación de cataratas en el cristalino, especialmente en pacientes diabéticos (Cabrera y col., 1980). A su vez los compuestos **ATS** y **QTS** demostraron efecto anticoagulante y capacidad inhibitoria de la agregación plaquetaria, siendo más activo el derivado tetrasulfatado, del cual además se demostró propiedades atitrombóticas (Guglielmone y col., 2002, 2005, 2012).

Además, se realizaron estudios sobre el efecto inhibitorio de QTS y ATS sobre la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), observándose que ninguno de los dos derivados sulfatados de quercetina posee actividad inhibitoria de la producción de NO en línea celular J774 (Ortega y col., 2010).

Si bien no existen estudios directos en cuanto a la actividad antioxidante de estos derivados sulfatados, existen evidencias que indican que ATS y QTS inhiben la función de varias enzimas deshidrogenasas implicadas en el mecanismo redox (Pérez y col., 1986), y un derivado sulfatado de quercetina aislado de hojas de *Plygonum hydropipper*, 3-sulfato de quercetina, demostró un efecto inhibitorio de la oxidación de lípidos y de la generación de $O_2^{\cdot-}$ (Yagi y col., 1994).

En el caso de **Q**, el aglicón del cual derivan los flavonoides sulfatados antes mencionados, es uno de flavonoides más ampliamente distribuido entre las plantas, al cual se le han demostrado una amplia gama de propiedades farmacológicas tales como actividad antibacteriana, antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*, anticancerígena, anticoagulante, antihipertensiva, antiproliferativa, efectos protectores contra osteoporosis, obesidad, diabetes, enfermedades respiratorias, neurodegenerativas y cardiovasculares, incluyendo además efectos protectivos contra el estrés oxidativo debido a su potente actividad antioxidante (Boots y col., 2008; D'Andrea, 2015; Procházková y col., 2011; Wang y col., 2016). En este sentido, diversos estudios han demostrado efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por múltiples agentes tóxicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Ajibade y col., 2016; Baltaci y col., 2016; Kalender y col. 2012; Liu y col., 2010; Nabavi y col., 2012; Nagata y col., 1999). A su vez, se ha demostrado que Q posee un potente efecto scavenger directo de ERO y ERN *in vivo* e *in vitro*, incluyendo los radicales $O_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot} , HO^{\cdot} , NO y $ONOO^-$ (Boots y col., 2008; D'Andrea, 2015; Wang y col., 2016); actividad quelante de metales de transición, principalmente Fe, Cu, Zn y Cd; actividad inhibitoria de xantina oxidasa, enzima responsable de la producción de $O_2^{\cdot-}$; actividad inhibitoria de la enzima iNOS que cataliza la síntesis de NO (Procházková y col., 2011), y efecto protector contra la depleción de α -tocoferol, un importante antioxidante en las membranas celulares y en lipoproteínas de baja densidad (Zhu y col., 2000).

Un punto importante a destacar es la actividad prooxidante que presentan los flavonoides la cual depende tanto de la estructura química como de la concentración del flavonoide. En este sentido, algunos estudios *in vitro* han demostrado que Q a concentraciones superiores a 100 μ M es capaz de incrementar la producción de H_2O_2 , la generación de $O_2^{\cdot-}$ y la peroxidación lipídica en linfocitos humanos, y de incrementar el daño en el ADN en leucocitos humanos (Wilms y col., 2008; Yen y col., 2003). Por otra parte, además de una acción prooxidante directa, estudios indicarían que Q es capaz de deteriorar antioxidantes de bajo peso molecular, por ejemplo es capaz de oxidar el ascorbato y GSH, además de inducir una disminución del contenido de GSH y la actividad de glutatión S-transferasa, enzima involucrada en los mecanismos de detoxificación de xenobióticos, en un modelo de núcleos de

hígado aislados de ratas lo cual favorecería su efecto prooxidante a altas concentraciones (Sahu y Gray, 1996). Asimismo, se ha determinado la toxicidad de Q *in vitro* asociada a la generación de productos tóxicos, tales como la denominada quercetin-quinona, generados por la oxidación del flavonoide ocurrida durante su actividad scavenger de ERO, capaces de formar aductos con diversos tioles (Boots y col., 2008), sin embargo, son necesarios mayores estudios *in vivo* que determinen si es posible un efecto prooxidante el cual dependerá del status redox de cada situación en particular.

1.6.2 Género *Prosopis* L.

El género *Prosopis* L. fue descrito por primera vez por Carl von Linnaeus en 1767 (Linnaeus, 1767), su nombre significa “máscara” en griego. Pertenece a la familia de las Fabáceas. Éste género se distribuye en regiones subtropicales y tropicales de América, África y el sudoeste de Asia. Debido a la gran diversidad morfológica de las especies de *Prosopis* en Sudamérica, se sugiere que esta región sería el centro de diversificación del género. Por su parte, en Argentina viven 31 especies que comprenden tanto especies de árboles como arbustos espinosos.

1.6.2.1 Antecedentes de la especie *Prosopis nigra* (Gris.) Hieron

🌀 Hábitat, características botánicas y usos medicinales

Prosopis nigra (Gris.) Hieron. var. *nigra* es una especie arbórea originaria de Sudamérica austral. En nuestro país se distribuye en la región norte y central del país, desde Jujuy hasta Misiones y desde San Juan hasta Buenos Aires. En Córdoba, habita

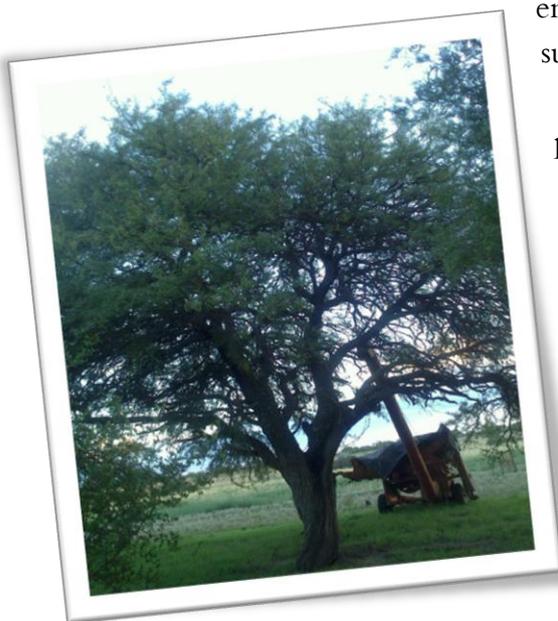


Figura 1.15: *Prosopis nigra* (Gris.) Hieron.

en el Espinal y Bosque Serrano. Prospera en suelo árido y resiste sequías, desarrollando sistemas radiculares extremadamente profundos. Es especialmente resistente a la salinidad y su madera es dura, densa y durable.

Es un árbol de hasta 10 m de altura, caducifolio, con espinas débiles, copa semiesférica, tronco rugoso y corteza persistente de color castaño oscura o castaño grisácea (Figura 1.15). Ramas flexuosas, arqueadas y péndulas. Hojas con 1 ó 2 juegos de folíolos (1-2 yugas) obtusas, pinnas de 2,5 a 7 cm de longitud, con 12-25 pares de

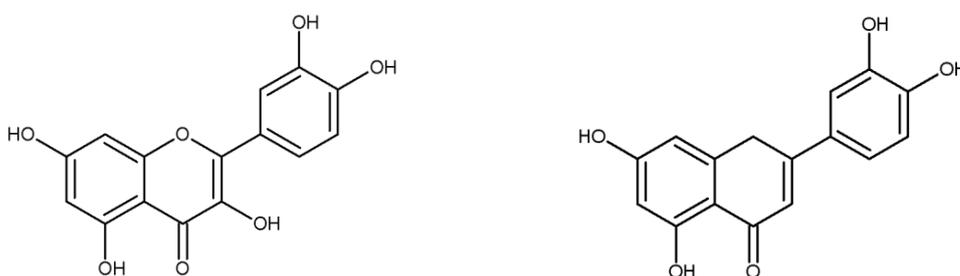
folíolos elíptico-lineales, de unos 2–7,5 mm de longitud por 1–2 mm de ancho. Espinas menores que las hojas, axilares, geminadas. Flores amarillentas o blanco-verdosas, reunidas en racimos espiciformes axilares. Cáliz y corola glabros; corola por dentro vellosa. Fruto lomento drupáceo, de pulpa dulce, arrosariado, con vaina coriácea, subleñosa, erecta o poco encorvada, apiculada, amarillenta, generalmente con manchas de color violáceo. Semillas elíptico-ovales, de color castaño claro. Florece en octubre y noviembre y sus frutos maduran a partir de diciembre, usándose en alimentación humana y animal, además de sus usos en la medicina popular. (Barboza y col., 2006; Del Vitto y col., 2011).

En nuestro país esta especie es conocida bajo los nombres de “algarrobo negro”, “algarrobo dulce”, “algarrobillo”, “pataia”, “paatáik” en lengua toba, “nabisét kirimít” en vilela. Popularmente los frutos son utilizados contra enfermedades de los ojos, enfermedades venéreas, asma y como digestivo; además se los utiliza con fines alimenticios, forrajeros y en la fabricación de bebidas. La madera es usada en la construcción de viviendas mientras que la corteza contiene una gomorresina que se emplea en curtiembre y para la fabricación de colorantes oscuros (Barboza y col., 2006; Soraru y Bandoni, 1978). No hay reportes sobre usos medicinales de las hojas de esta especie.

Estudios fitoquímicos en hojas: Flavonoides

Los estudios realizados sobre las hojas de *P. nigra* han determinado que las mismas contienen: proteínas y aminoácidos (Carman y col., 1974), flavonoides (Gianinetto y col., 1975) y alcaloides (Gianinetto y col., 1980; Moro y col., 1975).

En cuanto al grupo químico de flavonoides, se han aislado, 2 flavonoides aglicones: quercetina (flavonol) y luteolina (flavona) (Figura 1.6); y 4 flavonoides glicosilados: isovitexina y vitexina (glicósidos de apigenina), 7-glucósido de luteolina y 3-galactósido de isoramnetina (Figura 1.7) (Gianinetto y col., 1975).



Quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiflavona)

Luteolina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxiflavona)

Figura 1.16: Flavonoides aglicones aislados de hojas de *P. nigra*.

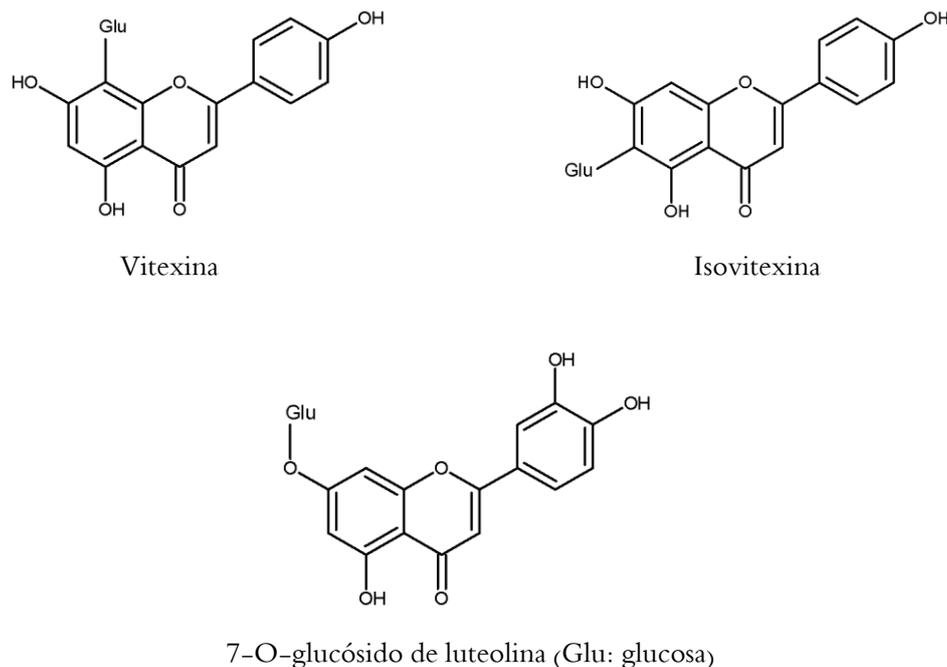


Figura 1.17: Flavonoides glicosilados aislados de hojas de *P. nigra*.

🔗 Estudios Actividad Biológica: Flavonoides Vitexina e Isovitexina

Los flavonoides de interés para esta tesis, aislados de *P. nigra*, son dos C-glucósidos, isómeros de posición, derivados del flavonoide aglicón, tipo flavona, apigenina. Los flavonoides C-glicósidos han recibido menos atención en comparación con los O-glicósidos. Sin embargo, el interés en este tipo de compuestos ha aumentado recientemente, ya que se han publicado algunos estudios que hacen hincapié en los efectos positivos de C-glicósidos en la salud humana. Además, si bien la presencia del azúcar en la estructura puede alterar diversas actividades biológicas respecto a los aglicones, varios autores asumen que los flavonoides C-glicosilados tendrían mejores propiedades terapéuticas que los aglicones y flavonoides O-glicosilados, dada su mayor estabilidad y solubilidad (Plaza y col., 2014; Rawat y col. 2009; Xiao y col., 2016).

Vitexina (V) ha recibido recientemente mayor atención debido a su amplia gama de efectos farmacológicos incluyendo actividad antioxidante, anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, antinociceptiva, antidiabética, antibacteriana, antihipertensiva, antiespasmódica, y acciones de tipo antidepresivas. Además, se ha demostrado que V posee efecto neuroprotector, tanto en convulsiones inducida en ratas por pentilentetrazol, como en excitotoxicidad neuronal inducida por glutamato y mejora el deterioro de la memoria inducido por escopolamina en ratas, por otra parte se ha determinado que V reduce el daño producido por isquemia cerebral (Min y col., 2015; Xiao y col., 2016). En cuanto al efecto neuroprotector de V existen reportes de que su efecto, contra la toxicidad inducida por el péptido β amiloide,

estaría mediada por una disminución de la producción de NO (Guimarães y col., 2015).

Centrándonos en su actividad antioxidante, Borghi y col. (2013), demostraron que **V** es capaz de reducir el dolor inflamatorio por un mecanismo en el cual estaría implicada la disminución de estrés oxidativo evitando la disminución de la concentración de GSH y la capacidad antioxidante total en tejido de ratón. A su vez, se determinó un potente efecto scavenger de $O_2^{\bullet-}$ *in vitro* y de ERO intracelulares en línea celular de fibroblastos expuestos a la luz UV y células epiteliales expuestas a calor (Bhardwaj y col., 2015; Kim y col., 2005). Vitexina a su vez, ha manifestado un efecto antienvjecimiento debido a sus propiedades antioxidantes dadas por su capacidad de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas y reducir los niveles de MDA en un modelo de envejecimiento en ratones (An y col., 2012). Por otra parte, Praveena y col. (2013), demostraron que la presencia de una unidad de glucosa en posición C-8 de **V** podría mejorar el potencial antioxidante *in vitro* debido al hecho de que la glicosilación en C-8 disminuye la carga negativa sobre el átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo. En cuanto a su actividad en células sanguíneas, existe un reporte que evidencia un efecto protector tanto de **V** como de **isovitexina (Iv)**, contra el estrés oxidativo inducido por HO[•] en el ADN y hemólisis de eritrocitos de rata inducida por H₂O₂ (Girish y col., 2016).

El segundo flavonoide C-glucósido de interés es la **Iv**. Sus efectos farmacológicos demostrados incluyen actividad antioxidante, anidiabética, antiviral, antiplaquetaria, hepatoprotectora, antiinflamatoria y neuroprotectora (Dos Santos y col., 2016; Xiao y col., 2016).

En cuanto a su actividad antioxidante, además del efecto protector en eritrocitos mencionado anteriormente, podemos señalar un efecto antioxidante en lesión pulmonar aguda inducida por lipopolisacárido tanto *in vitro* como *in vivo* demostrando una disminución en la producción de ERO y los niveles de MPO y MDA mientras que aumenta el nivel de GSH y SOD (Lv y col., 2016). A su vez existen reportes de su actividad antirradicalaria, demostrando una fuerte inhibición del ROO[•] *in vitro* (Kang y col., 2011), así como también capacidad inhibitoria del radical DPPH y poder reductor de Fe (Zhang y col., 2011).

En cuanto al posible efecto pro-oxidante de estos flavonoides, no existen hasta el momento reportes de estudios realizados en este sentido. Tal y como se mencionó anteriormente, el interés por los efectos antioxidantes de los flavonoides C-glicosilados es bastante reciente por ello la necesidad de avanzar sobre sus posibles aplicaciones en esta área de estudio.

1.6.2.2 Antecedentes de la especie *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth var. *strombulifera*

🌀 Hábitat, características botánicas y usos medicinales

Prosopis strombulifera (Lam.) Benth var. *strombulifera* es una especie arbustiva del género *Prosopis* que crece en la región centro y norte de nuestro país, desde Salta hasta Río Negro al sur y desde San Juan hasta Buenos Aires. Es un interesante elemento del monte xerófilo y halófilo. En Córdoba habita en el Bosque Chaqueño.

Es un arbusto perenne, espinoso y rizomatoso de hasta 1,5 metros de altura, con tallos flexuosos, estriados longitudinalmente, estípulas divergentes, rectas, grises de hasta 0,8–2 mm. Hojas pequeñas, bipinnadas, uniyugas, con 3–8 folíolos de color



Figura 1.18: *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth var. *strombulifera*

verde azulado. Flores amarillas en cabezuelas globosas. Cáliz pubérulo muy corto. Pétalos unidos hasta la mitad, pubescentes por dentro. Frutos de color amarillo claro, formando una densa espiral cerrada, con 6–17 espiras, generalmente de 4–7 cm de longitud. Semillas ovales, castañas. Rebrotta en primavera, florece y fructifica en verano (Figura 1.18).

Los nombres más comunes por los que se conoce a esta especie son “retortuño”, “retortón”, “mastuerzo”, “pico de loro”.

Entre sus principales usos en la medicina popular podemos mencionar el uso de su fruto como astringente, antiodontálgico, antiinflamatorio y anti-diarreico. Particularmente, las decocciones de estos frutos se utilizan para la disentería y diarrea, además de dolores de muelas y para hacer gárgaras en caso de dolores de garganta (Barboza y col., 2006; Saragusti y col., 2012).

🌀 Estudios fitoquímicos en hojas y frutos: Flavonoides

Estudios fitoquímicos previos de nuestro grupo de investigación realizados sobre las partes aéreas de esta especie, particularmente las hojas, revelaron presencia de un flavonoide aglicón: luteolina y 6 flavonoides glicosilados: 7–glucósido de luteolina, vitexina, isovitexina, quercitrina, ramnosilvitexina y rutina (Figura 1.19) (Gitelli y col., 1981).

También se inició un estudio cuali y cuantitativo en cuanto al contenido de flavonoides en los frutos de esta especie, demostrando la presencia de flavonoides glicosilados y aglicones (Bustos y col, 2008). Posteriormente, se obtuvieron extractos

ricos en flavonoides y se continuó con las tareas de aislamiento e identificación de los flavonoides presentes en los mismos. La presente tesis, se abocó al aislamiento e identificación de luteolina en los frutos.

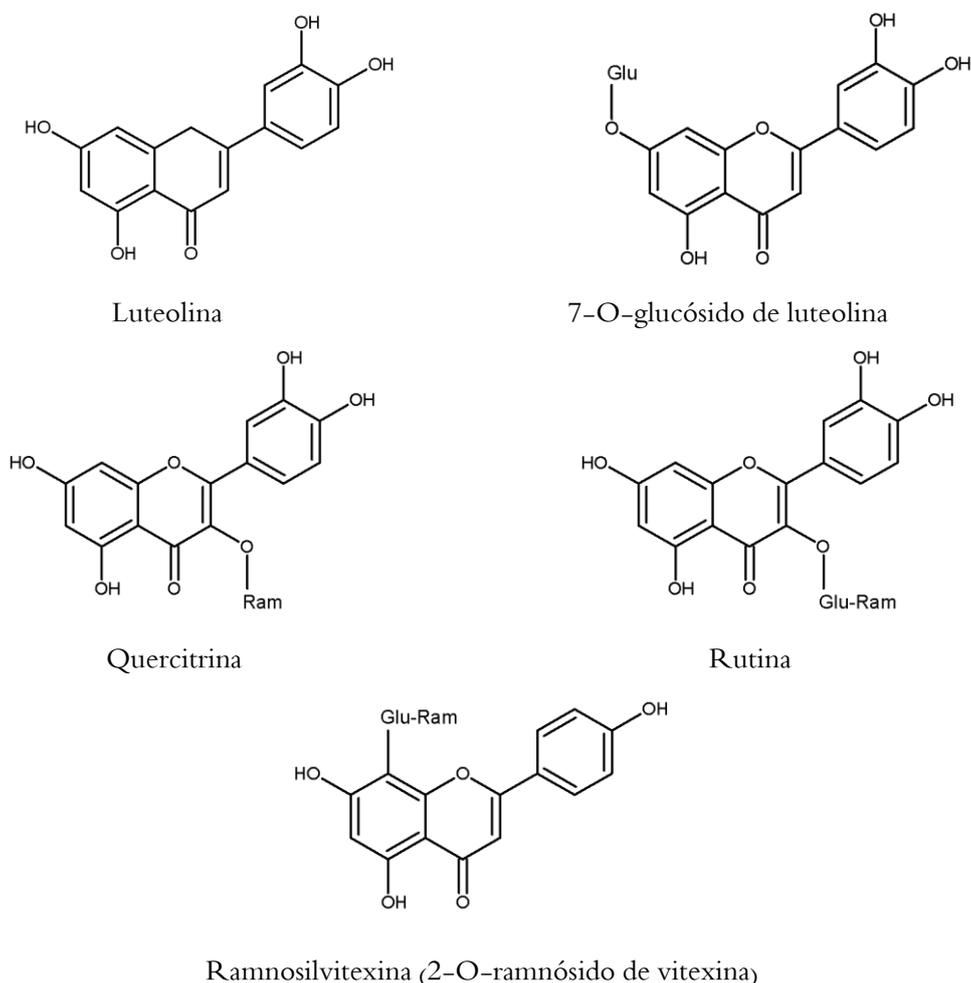


Figura 1.19: Flavonoides aislados de hojas de *P. strombulifera* var. *strombulifera*.

🔗 Estudios Actividad Biológica: Flavonoide Luteolina

En cuanto al flavonoide de interés que buscamos aislar en los frutos de esta especie vegetal, **Luteolina (L)**, se trata de un flavonoide de tipo flavona aglicón con reconocida actividad antioxidante, antiinflamatoria antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, antifúngica, anticancerígena, cardioprotectiva, antidiabética y antialérgica (López-Lázaro, 2009).

Respecto a su actividad antioxidante, existen estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que han demostrado que L posee actividad scavenger directa de RL tales como el radical ABTS así como de ERN y ERO, tales como $O_2^{\cdot-}$ y ROO^{\cdot} , además, capacidad quelante de metales de transición, activación de enzimas antioxidantes endógenas como SOD y CAT, habilidad de inhibir enzimas oxidantes como la enzima xantina oxidasa, NADPH oxidasa y MPO, así como también, efectos inhibitorios sobre la

producción de NO (López-Lázaro, 2009; Procházková y col., 2011). Diversos estudios han demostrado que L es capaz de disminuir la producción de ERO en diversos tipos celulares, tal es el caso de su capacidad de disminuir las ERO inducidas por radiación UV-A en fibroblastos humanos (Yan y col., 2016), el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en células PC12 (Lin y col., 2015) y en macrófagos peritoneales estimulados por angiotensina II (Zhang y col., 2014). Particularmente en células sanguíneas se ha determinado la capacidad de L de atenuar el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en eritrocitos humanos, observándose una disminución de la producción de ERO y peroxidación lipídica y una recuperación de la actividad de enzimas antioxidantes alcanzando los niveles basales (An y col., 2016)

En cuanto a estudios realizados *in vivo* de L como agente protector frente a distintos inductores de ERO, hay estudios realizados en carcinogénesis en colon de ratas, mediada por la producción de ERO inducida por 1,2-dimethylhydrazine, en la cual se observó que L fue capaz de disminuir la lipoperoxidación e incrementar la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas (Manju y Nalini, 2005), estudios de su efecto antioxidante frente al estrés oxidativo inducido por estreptozotocina en un modelo de diabetes en ratas (Chen y col., 2015) y efecto protector sobre peroxidación lipídica y enzimas antioxidantes en un modelo de infarto de miocardio en ratas (Madhesh y Vaiyapuri, 2012).

Con respecto a su efecto prooxidante, L es capaz de deteriorar antioxidantes de bajo peso molecular, por ejemplo es capaz de oxidar el ascorbato y GSH (Procházková y col., 2011). A su vez se ha observado un efecto citotóxico de L a 40 µM medida por ERO, vía NADPH oxidasa y activación del gen p53, en células de hepatoma humano (Zhang y col., 2015), e inducción de apoptosis en células de colangiocarcinoma mediada por un aumento de la producción de ERO y disminución del contenido de GSH a una concentración de 25 µM (Kittiratphatthana y col., 2016). Sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente, el efecto biológico y farmacológico de un flavonoide va a depender de su comportamiento, ya sea como un antioxidante o un prooxidante, lo cual va a depender del estatus redox de cada situación en particular.

Así, dada la importancia del estudio de las plantas medicinales con el fin de obtener compuestos de uso terapéutico, y debido al creciente campo de investigación que involucra los efectos tóxicos de diversas drogas producidos por la generación de estrés oxidativo, se manifiesta la importancia de poder encontrar productos obtenidos de la naturaleza, que tengan la capacidad de contrarrestar los efectos tóxicos informados por ser producidos por ciertos antibióticos. Dentro del amplio grupo de metabolitos de origen vegetal, los flavonoides despiertan un gran interés para su estudio, debido a sus propiedades como quelantes y “scavengers” de RL, que los hacen ser considerados como potenciales agentes protectores de los efectos tóxicos inducidos por antibióticos que se relacionan con un desbalance del equilibrio oxidativo. Si bien existen estudios sobre los flavonoides abordados en el presente

trabajo de tesis, que revelan la actividad antioxidante de los mismos, es necesario destacar que por un lado, solo la evaluación de cada sistema en particular puede develar la actividad predominante en cuanto al efecto anti y prooxidante de los mismos, y por el otro que no existen hasta el momento reportes que evalúen el efecto de estos compuestos naturales como protectores del estrés oxidativo inducido por antibióticos en células sanguíneas.

A su vez, debido a que en los últimos años se ha revelado la participación del estrés oxidativo como un mecanismo de acción por el cual ciertos antibióticos atacan a las células bacterianas, además de los mecanismos específicos ya conocidos de cada uno de ellos (Kohanski y col., 2007), se hace fundamental evaluar el efecto de los flavonoides sobre la actividad antimicrobiana de los mismos.

Por lo tanto se propone evaluar el efecto de flavonoides sobre el estrés oxidativo inducido por antibióticos en células sanguíneas, con el objeto de aportar coadyuvantes a la medicación que permitirían disminuir los efectos secundarios por ellos presentados, sin alterar su actividad antimicrobiana.

Para ello, el estrés oxidativo puede ser detectado ya sea midiendo directamente las especies reactivas generadas, mediante la determinación de biomarcadores o productos de las reacciones oxidativas (peroxidación lipídica, oxidación del ADN, oxidación de proteínas), y/o mediante la evaluación de las defensas antioxidantes.

1.7 Bibliografía

- Abdel-Zaher, A.O., Afify, A.M., Kamel, S.M., Farghaly, H.M., El-Osely, G.M., El-Awaad, E.A., 2012. Involvement of glutamate, oxidative stress and inducible nitric oxide synthase in the convulsant activity of ciprofloxacin in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 685 (1-3), 30-37.
- Abdelsameea, A.A, Mohamed, A.M., Amer, M.G., Attia, S.M., 2016. Cilostazol attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 68 (4), 247-253.
- Ademiluyi, A.O., Oboh, G., Owoloye, T.R., Agbebi, O.J., 2013. Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (6), 470-475.
- Agnese, A.M., Nuñez Montoya, S., Ariza Espinar, L., Cabrera J.L., 1999. Chemotaxonomic features in Argentinean species of *Flaveria* (Compositae). *Biochem. Syst. Ecol.* 27 (7), 739-742.
- Agrawal, N., Ray, R.S., Farooq, M., Pant, A.B., Hans, R.K., 2007. Photosensitizing potential of ciprofloxacin at ambient level of UV radiation. *Photochem Photobiol.* 83 (5), 1226-1236.
- Ajibade, T.O., Oyagbemi, A.A., Omobowale, T.O., Asenuga, E.R., Adigun, K.O., 2016. Quercetin and Vitamin C mitigate cobalt chloride-induced hypertension through reduction in oxidative stress and nuclear factor kappa beta (NF-Kb) expression in experimental rat model. *Biol Trace Elem Res.* (En prensa).

- Al-Gubory, K.H., Fowler, P.A., Garrel, C., 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (10), 1634–1650.
- Albuquerque, R.V., Malcher, N.S., Amado, L.L., Coleman, M.D., Dos Santos, D.C., Borges, R.S., Valente, S.A., Valente, V.C., Monteiro, M.C., 2015. *In vitro* protective effect and antioxidant mechanism of resveratrol induced by dapsone hydroxylamine in human cells. *PLoS One.* 10 (8), e0134768.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucić, B., Trinajstić, N., 2007. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr. Med. Chem.* 14 (7), 827–845.
- An, F., Wang, S., Yuan, D., Gong, Y., Wang, S., 2016. Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by plant-derived flavonoids, orientin and luteolin. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016, 3401269.
- An, F., Yang, G., Tian, J., Wang, S., 2012. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regen. Res.* 7 (33), 2565–2575.
- Arai, Y., Nakamura, Y., Inoue, F., Yamamoto, K., Saito, K., Furusawa, S., 2000. Glucocorticoid-induced apoptotic pathways in eosinophils: comparison with glucocorticoid-sensitive leukemia cells. *Int. J. Hematol.* 71 (4), 340–349.
- Atli, O., Demir-Ozkay, U., Ilgin, S., Aydin, T.H., Akbulut, E.N., Sener, E., 2016. Evidence for neurotoxicity associated with amoxicillin in juvenile rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 35 (8), 866–76.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014, 360438.
- Babior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W., 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2), 342–344.
- Balakumar, P., Rohilla, A., Thangathirupathi, A., 2010. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol. Res.* 62 (3), 179–186.
- Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., Hammond, C.L., 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.* 390 (3), 191–214.
- Ballester, M., 1996. Antioxidant, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach. *Med. Clin. (Barc).* 107 (13), 509–515.
- Barboza, G.E., Cantero, J.J., Nuñez, C.O., Ariza Espinar, L. (Eds.), 2006. Flora medicinal de la provincia de Córdoba. Pteridófitas y antófitas silvestres o naturalizadas. Museo Botánico: Córdoba.
- Baltacı, B.B., Uygur, R., Caglar, V., Aktas, C., Aydin, M., Ozen, O.A., 2016. Protective effects of quercetin against arsenic-induced testicular damage in rats. *Andrologia.* 48 (10), 1202–1213.

- Becerra, M.C., Eraso, A.J., Albesa I., 2003. Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdine in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. *Lumin.* 18 (6), 334–340.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidase: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87 (1), 245–313.
- Bergsten, P., Amitai, G., Kehrl, J., Dhariwal, K.R., Klein, H.G., Levine, M., 1990. Millimolar concentrations of ascorbic acid in purified human mononuclear leukocytes. Depletion and reaccumulation. *J. Biol Chem.* 265 (5), 2584–2587.
- Bhardwaj, M., Paul, S., Jakhar, R., Kang, S.C., 2015. Potential role of vitexin in alleviating heat stress-induced cytotoxicity: Regulatory effect of Hsp90 on ER stress-mediated autophagy. *Life Sci.* 142, 36–48.
- Blausen.com staff. "Blausen gallery 2014". Wikiversity Journal of Medicine. DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 20018762.
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., 2008. Health effects of quercetin : From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585 (2–3), 325–337.
- Borghini, S.M., Carvalho, T.T., Staurenghi-Ferrari, L., Hohmann, M.S., Pinge-Filho, P., Casagrande, R., Verri, W.A. Jr., 2013. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *J Nat Prod.* 76(6), 1141–1149.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128 (3), 617–630.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L., 2010. Oxygen toxicity : chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 15 (4), 186–190.
- Bustos, P., Cabrera, J.L., Ortega, M.G., 2008. Búsqueda de drogas antioxidantes a partir de plantas autóctonas bioactivas. 3° Workshop argentino de química medicinal, Los Cocos, Argentina.
- Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1976. Quercetin-3 acetyl-7,3',4'-trisulphate from *Flaveria bidentis*. *Lloydia.* 39, 253–254.
- Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1979. Two new quercetin sulphates from *Flaveria bidentis*. *Phytochem.* 18, 510–511.
- Cabrera, J.L., Juliani, H.R., Gros, E.G., 1985. Quercetin 3,7,3'-trisulphate from *Flaveria bidentis*. *Phytochem.* 24, 1394–1395.
- Cabrera, J.L., Juliani, H.R., Pohl, M.G., Varma, S.D., 1980. Inhibition of rat aldose reductase by flavonoid esters. *Invest. Ophthalmol. And Vis. Sci.* Annual Spring Meeting, Orlando, Florida, USA.
- Carman, N., Dossaji, S., Mabry, T., 1974. A populational survey of amino acids in *Prosopis* species from North and South America. *Biochem. Syst. Ecol.* 2, 73.
- Chang, M.Y., Byon, S.H., Shin, H.C., Han, S.E., Kim, J.Y., Byun, J.Y., Lee, J.D., Park, M.K., 2016. Protective effects of the seaweed phlorotannin polyphenolic compound dieckol on gentamicin-induced damage in auditory hair cells. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 83: 31–36.
- Chen, Y., Sun, X.B., Lu, H.E., Wang, F., Fan, X.H., 2015. Effect of luteolin in delaying cataract in STZ-induced diabetic rats. *Arch. Pharm. Res.* 2015. (En prensa).

- Correa Salde, V.A., 2011. Efecto de fármacos a nivel del equilibrio de especies reactivas: consecuencias moleculares y celulares (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Correa Salde, V., Albesa, I., 2009. Reactive oxidant species and oxidation of protein and hemoglobin as biomarkers of susceptibility to stress caused by chloramphenicol. *Biomed. Pharmacother.* 63 (2), 100–104.
- D'Andrea, G., 2015. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia.* 106, 256–271.
- Davies, K.J., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* 262 (20), 9895–9901.
- Davies, K.J., Delsignore, M.E., Lin, S.W., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* 262 (20), 9902–9907.
- Dedon, P.C., Goldberg, I.H., 1992. Free-radical mechanism involved in the formation of sequence-dependent bistranded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin, neocarzinostatin, and calicheamicin. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (3), 311–332.
- Del Vitto, L.A., Petenatti, E.M., Petenatti, M.E., 2011. Flores y plantas de la Reserva Natural Mogote Bayo y costa de la sierra de Comechingones, Merlo, San Luis, Argentina. Fundación Espacios Verdes: Buenos Aires.
- Denamur, S., Tyteca, D., Marchand-brynaert, J., Bambeke, F.V., Tulkens, P.M., Courtoy, P.J., Mingeot-leclercq, M., 2011. Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free Radic. Biol. Med.* 51 (9), 1656–1665.
- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione-dependent enzymes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1830 (5), 3217–3266.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanism and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32 (11), 1102–1115.
- Dos Santos, K.C., Borges, T.V., Olescowicz, G., Ludka, F.K., Santos, C.A., Molz, S., 2016. Passiflora actinia hydroalcoholic extract and its major constituent, isovitexin, are neuroprotective against glutamate-induced cell damage in mice hippocampal slices. *J. Pharm. Pharmacol.* 68 (2):282–291.
- Dreosti, I.E., 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutrition.* 16 (7–8), 692–694.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82 (1), 47–95.
- Eraso, A.J., Albesa, I., 2007. Eriobotrya japonica counteracts reactive oxygen species and nitric oxide stimulated by chloramphenicol. *Am. J. Chin. Med.* 35 (5), 875–885.
- Farombi, E.O., Adaramoye, O.A., Emerole, G.O., 2002. Influence of chloramphenicol on rat hepatic microsomal components and biomarkers of oxidative stress: Protective role of antioxidants. *Pharmacol. Toxicol.* 91 (3), 129–134.

- Fenton, H.J.H., 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65 (65): 899–911.
- Forman, H.J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects. Med.* 22 (4–5), 189–216.
- Fouad, A.A., Albuali, W.H., Zahran, A., Gomaa, W., 2014. Protective effect of naringenin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38 (2), 420–429.
- Frei, B., 1991. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 54 (6), 1113S–1118S.
- García Morales, O.H., Pereira Roche, N., Flores Sánchez, R.M., 1998. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 17 (3): 190–197.
- Gianinetto, I.B., Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1980. Isolation of N-methylcassine from species of the genus *Prosopis*. *J. Nat. Prod.* 43 (5), 632–633.
- Gianinetto, I.B., Cabrera, J.L., Oberti, J.C., Juliani, H.R., 1975. Flavonoids of the Genus *Prosopis*. I. *Lloydia.* 38, 265–267.
- Girish, T.K., Anil Kumar, K., Prasada Rao, U.J.S., 2016. C-Glycosylated flavonoids from black gram husk: Protection against DNA and erythrocytes from oxidative damage and their cytotoxic effect on HeLa cells. *Toxicol. Rep.* 3, 652–663.
- Gitelli, A.M., Gianinetto, I.B., Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1981. Flavonoides en el género *Prosopis* (Leguminosae)–Parte IV. *Anales Asoc. Quím. Argent.* 69, 33–36.
- Goodman, J., Hochstein, P., 1977. Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 (2), 797–803.
- Guglielmone, H.A., Agnese, A.M., Núñez Montoya, S.C., Cabrera, J.L., 2002. Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaveria bidentis*. *Tromb. Res.* 105 (2), 183–188.
- Guglielmone, H.A., Agnese, A.M., Núñez Montoya, S.C., Cabrera, J.L., 2005. Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. *Tromb. Res.* 115 (6), 495–502.
- Guglielmone, H.A., Núñez Montoya, S.C., Agnese, A.M., Pellizas, C.G., Cabrera, J.L., Donadio, A.C., 2012. Quercetin 3,7,3',4'-tetrasulphated isolated from *Flaveria bidentis* inhibits tissue factor expression in human monocyte. *Phytomedicine.* 19 (12), 1068–1071.
- Guimarães, C.C., Oliveira, D.D., Valdevite, M., Saltoratto, A.L., Pereira, S.I., França, S de C., Pereira, A.M., Pereira, P.S., 2015. The glycosylated flavonoids vitexin, isovitexin, and quercetrin isolated from *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) leaves protect PC12 cells against amyloid- β 25–35 peptide-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 86, 88–94.
- Gürbay, A., Gonthier, B., Barret, L., Favier, A., Hincal, F., 2007. Cytotoxic effect of ciprofloxacin in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. *Toxicology.* 229 (1–2), 54–61.

- Guyton, C.G., Hall, J.E., 2006. Tratado de Fisiología Médica (11ª Edición). Elsevier: España.
- Haber, F., Weiss, J., 1934. The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London.* 147 (861), 332-351.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141 (2), 312-322.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc. Trans.* 35, 1147-1150.
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Rev.* 70 (5), 257-265.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715S-724S.
- Halliwell, B., Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 10, 5-12.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), 1999. Free Radicals in Biology and Medicine (3ª Edición). Oxford Univ. Press: New York.
- Hincal, F., Gürbay, A., Favier, A., 2003. Biphasic response of ciprofloxacin in human fibroblast cell cultures. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 1 (4), 481-492.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W., 2000. Flavonols, flavones and flavanols: Nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081-1093
- Holt, D.E., Ryder, T.A., Fairbairn, A., Hurley, R., Harvey, D., 1997. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: I. In vitro effects on cells in culture. *Hum. Exp. Toxicol.* 16 (10), 570-576.
- Hou, Z., Lambert, J.D., Chin, K.V., Yang, A.S., 2004. Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutat. Res.* 555 (12), 3-19.
- Ilgin, S., Can, O.D., Atli, O., Ucel, U.I., Sener, E., Guven, I., 2015. Ciprofloxacin-induced neurotoxicity: evaluation of possible underlying mechanisms. *Toxicol. Mech. Methods.* 25 (5), 374-381.
- Jiang, J., Briedé, J.J., Jennen, D.G., Van Summeren, A., Saritas-Brauers, K., Schaart, G., Kleinjans, J.C., de Kok, T.M., 2015. Increased mitochondrial ROS formation by acetaminophen in human hepatic cells is associated with gene expression changes suggesting disruption of the mitochondrial electron transport chain. *Toxicol. Lett.* 234 (2), 139-150.
- Jussieu, A.L., 1789. Genera Plantarum. 186-187.
- Kalender, Y., Kaya, S., Durak, D., Uzun, F.G., Demir, F., 2012. Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environm. Toxicol. Pharmacol.* 33 (2), 141-148.
- Kalinina, E.V., Chernov, N.N., Novichkova, M.D., 2014. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry.* 79 (13), 1562-1583.

- Kaneider, N.C., Leger, A.J., Kuliopulos, A., 2006. Therapeutic targeting of molecules involved in leukocyte–endothelial cell interactions. *FEBS J.* 273 (19), 4416–4424.
- Kang, J., Xie, C., Li, Z., Nagarajan, S., Schauss, A.G., Wu, T., Wu, X., 2011. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chem.* 128 (1), 152–157.
- Karbowski, M., Kurono, C., Wozniak, M., Ostrowski, M., Teranishi, M., Soji, T., Wakabayashi, T., 1999. Cycloheximide and 4-OH-TEMPO suppress chloramphenicol-induced apoptosis in RL-34 cells via the suppression of the formation of megamitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1449(1), 25–40.
- Keeney, J.T., Miriyala, S., Noel, T., Moscow, J.A., St Clair, D.K., Butterfield, D.A., 2015. Superoxide induces protein oxidation in plasma and TNF- α elevation in macrophage culture: Insights into mechanisms of neurotoxicity following doxorubicin chemotherapy. *Cancer Lett.* 367 (2), 157–161.
- Kehrer, J.P., Tipple, T.E., Robertson, J.D., Smith, C.V., 2015. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. En: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier: Países Bajos.
- Kim, J.H., Lee, B.C., Sim, G.S., Lee, D.H., Lee, K.E., Yun, Y.P., Pyo, H.B., 2005. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Arch. Pharm. Res.* 28 (2), 195–202.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S., Uchida, Y., Arihiro, K., 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J. Pathol.* 208(3), 319–326.
- Kim, S., Choe, J.H., Lee, G.J., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Lee, H.M., Jin, H.S., Kim, T.S., Kim, J.M., Cho, M.J., Shin, E.C., Jo, E.K., Kim, J.S., 2016. Ionizing Radiation Induces Innate Immune Responses in Macrophages by Generation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Radiat. Res.* [En prensa]
- Kittiratphatthana, N., Kukongviriyapan, V., Prawan, A., Senggunprai, L., 2016. Luteolin induces cholangiocarcinoma cell apoptosis through the mitochondrial-dependent pathway mediated by reactive oxygen species. *J. Pharm. Pharmacol.* 68 (9), 1184–1192.
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77 (5), 598–625.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., Collins, J.J., 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 130 (5), 797–810.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Phatol.* 30 (6), 620–650.
- Korycka-Dahi, M., Richardson, T., 1981. Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk. *J. Dairy. Sci.* 63, 1181–1208.
- Kurutas, E.B., 2016. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J.* 15 (1), 71–93.

- Lamberto, S.A., Valle, A.F., Aramayo, E.M., Andrada, A.C., 1997. Manual ilustrado de las plantas silvestres de la región de Bahía Blanca. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur: Bahía Blanca, Argentina.
- Laporte, J.R., Vidal, X., Ballarin, E., Ibanez, L., 1998. Possible association between ocular chloramphenicol and aplastic anaemia—the absolute risk is very low. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46 (2), 181–184.
- Lin, P., Tian, X.H., Yi, Y.S., Jiang, W.S., Zhou, Y.J., Cheng, W.J., 2015. Luteolin-induced protection of H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells and the associated pathway. *Mol. Med. Rep.* 12 (5), 7699–7704.
- Linnaeus, C., 1767. *Systema Naturae*. 12(2); 282–293.
- Liu, C., Ma, J., Sun, Y., 2010. Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30 (3), 264–271.
- López-Lázaro, M., 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev. Med. Chem.* 9 (1), 31–59.
- Lv, H., Yu, Z., Zheng, Y., Wang, L., Qin, X., Cheng, G., Ci, X., 2016. Isovitexin exerts anti-inflammatory and antioxidant activities on Lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPK and NF- κ b and activating HO-1/Nrf2 pathways. *Int J Biol Sci.* 12 (1), 72–86.
- Madhesh, M., Vaiyapuri, M., 2012. Effect of luteolin on lipid peroxidation and antioxidants in acute and chronic periods of isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *J. Acute. Med.* 2 (3), 70–76.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (5), 727–747.
- Manascero Gómez, A.R. (Ed.), 2003. Hematología herramientas para el diagnóstico: atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. CEJA: Bogotá.
- Manju, V., Nalini, N., 2005. Chemopreventive potential of luteolin during colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Ital. J. Biochem.* 54 (3–4), 268–275.
- Martínez, L.J., Sik, R.H., Chignell, C.F., 1998. Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. *Photochem. Photobiol.* 67 (4), 399–403.
- Mason, R.P., 1982. Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. En: Pryor, W.A. (Ed.). *Free Radicals in Biology*, vol V. Academic Press: New York.
- Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S., Hayek, M.G., 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1462S–1476S.
- Min, J.W., Hu, J.J., He, M., Sanchez, R.M., Huang, W.X., Liu, Y.Q., Bsoul, N.B., Han, S., Yin, J., Liu, W.H., He, X.H., Peng, B.W., 2015. Vitexin reduces hypoxia-ischemia neonatal brain injury by the inhibition of HIF-1 α in a rat pup model. *Neuropharmacology.* 99, 38–50.
- Moro, G.A., Graziano, M.N., Coussio, J.D., 1975. Alkaloids of *Prosopis nigra*. *Phytochem.* 14 (3), 827.

- Mytar, B., Siedlar, M., Woloszym, M., Ruggiero, I., Pryjma, J., Zembala, M., 1999. Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br. J. Cancer*. 79 (5-6), 737-743.
- Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Eslami, S., Moghaddam, A.H., 2012. In vivo protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. *Food Chem*. 132, 931-935.
- Nagata, H., Takekoshi, S., Takagi, T., Honma, T., Watanabe, K., 1999. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 24 (1), 1-11.
- Organización Mundial de la Salud, 2004. Formulario Modelo de la OMS 2004 (2ª Edición). Recuperado el 30 de Diciembre de 2016 de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/10.2.2.html>
- Organización Mundial de la Salud, 2016. Resistencia a los microbios. Nota Descriptiva. Recuperado el 26 de Diciembre de 2016, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Oroian, M., Escriche, I., 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Intern.* 74, 10-36.
- Ortega, M.G., Saragusti, A.C., Cabrera, J.L., Chiabrand, G.A., 2010. Quercetin tetraacetyl derivative inhibits LPS-induced nitric oxide synthase (iNOS) expression in J774A.1 cells. *Arch Biochem Biophys*. 498 (2), 105-110.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I., 2008. Chloramphenicol-Induced Oxidative Stress in Human Neutrophils. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103 (4), 349-353.
- Paiva, C.N., Bozza, M.T., 2014. Are reactive species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal*. 20, 1000-1037.
- Palacios Vaccaro, J., 1997. Plantas Medicinales Nativas del Perú. Serie Ciencias. CONCYTEC: Lima, Perú.
- Pereyra de Santiago, O.J., Juliani, H.R., 1972. Isolation of quercetin 3,7,3',4'-tetrasulphate from *Flaveria bidentis* L. Otto Kuntze. *Experientia*. 28(4), 380-381.
- Perez, C., Anesini, C., 1994. In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *J. Ethnopharmacol.* 44 (1), 41-46.
- Pérez, L.M., Rojas, C.V., Cori, O., 1986. The use of quercetin sulphates from *Flaveria bidentis* as inhibitors of the enzymic reduction of carbonyl groups. *Phytochem.* 25 (7), 1587-1589.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55-74.
- Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K.Z., Turner, C., Karlsson, E.N., 2014. Substituent effects on in vitro antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 62 (15), 3321-3333.
- Popadic, S., Popadic, D., Ramic, Z., Mostarica Stojkovic, M., Trajkovic, V., Milinkovic, M., Medenica, L., 2006. Chloramphenicol induces in vitro growth arrest and apoptosis of human keratinocytes. *Cell Biol Toxicol.* 22 (5), 371-379.

- Praveena, R., Sadasivam, K., Kumaresan, R., Deepa, V., Sivakumar, R., 2013. Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 103, 442–452.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Flavonoids antioxidantes y prooxidantes. *Fitoterapia*. 82 (4), 513–523.
- Qin, P., Liu, R., 2013. Oxidative stress response of two fluoroquinolones with catalase and erythrocytes: a combined molecular and cellular study. *J. Hazard. Mater.* 252–253, 321–329.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 2000. *Farmacología*. (4^a Edición). Harcourt Brace: Madrid.
- Rawat, P., Kumar, M., Sharan, K., Chattopadhyay, N., Maurya, R., 2009. Ulmosides A and B: Flavonoid 6-C-glycosides from *Ulmus wallichiana*, stimulating osteoblast differentiation assessed by alkaline phosphatase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (16), 4684–4687.
- Ray, R.S., Agrawal, N., Misra, R.B., Farooq, M., Hans, R.K., 2006. Radiation-induced *in vitro* phototoxic potential of some fluoroquinolones. *Drug Chem. Toxicol.* 29 (1), 25–38.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2 (4), 152–159.
- Saeidnia, S., Abdollahi, M., 2013. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271 (15), 49–63.
- Sahu, S.C., Gray, G.C., 1996. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.* 104 (2), 193–196.
- Saniabadi, A.R., Wada, K., Umemura, K., Sakuma, S., Nakashima, M., 1996. Impairment of phagocytic cell respiratory burst by UVA in the presence of fluoroquinolones: an oxygen-dependent phototoxic damage to cell surface microvilli. *J. Photochem. Photobiol B.* 33 (2), 137–142.
- Sankar, M., Rajkumar, J., Devi, J., 2015. Hepatoprotective activity of hepatoplus on isoniazid and rifampicin induced hepatotoxicity in rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28 (3), 983–990.
- Saragusti, A.C., Bustos, P.S., Pierosan, L., Cabrera, J.L., Chiabrande, G.A., Santos, A.R., Ortega, M.G., 2012. Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in the antinociception caused by fruits of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. *J. Ethnopharmacol.* 140 (1), 117–122.
- Sen, C.K., 2000. Cellular tiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell Regul.* 36, 1–30.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. *J. Funct. Foods.* 18, 820–897.
- Shibutani, S., Takeshita, S., Grollman, A.P., 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 349 (6308), 431–434.

- Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* 25, 1058–1071.
- Soraru, S.B., Bandoni, A.L., 1978. Plantas de la medicina popular argentina. Editorial Albatros: Buenos Aires.
- Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797–821.
- Suárez, S.S., Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1979. Flavonoides en *Flaveria bidentis* (L.) O.K. y *Flaveria bidentis* var. *Angustifolia* O.K. (Compuestas). *Anales Asoc. Quím. Argent.* 67, 229–230.
- Sweetman, S.C. (Ed.), 2009. Martindale the complete drug reference. Pharmaceutical Press: London.
- Talla, V., Veerareddy, P.R., 2011. Oxidative stress induced by fluoroquinolones on treatment for complicated urinary tract infections in Indian patients. *J. Young Pharm.* 3 (4), 304–309.
- Tolosa H, 2012. Flora Bonaerense. Fique (*Flaveria bidentis*). Recuperado el 01 de Agosto de 2016 de <https://florabonaerense.blogspot.com.ar/2012/08/fique-flaveria-bidentis.html>
- Tórtora, G.J., Derrickson, B., 2013. Principios de anatomía y fisiología (13^a Edición). Médica Panamericana: Buenos Aires.
- Trnková, L., Drsata, J., Bousova, I., 2015. Oxidation as an important factor of protein damage: Implications for Maillard reaction. *J Biosci.* 40 (2), 419–439.
- Umezawa, N., Arakane, K., Ryu, A., Mashiko, S., Hirobe, M., Nagano, T., 1997. Participation of reactive oxygen species in phototoxicity induced by quinolone antibacterial agents. *Arch Biochem Biophys.* 342 (2), 275–281.
- Valko, M., Morris, H., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12 (10), 1161–1208.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr. Pharm. Des.* 10 (14), 1677–1694.
- Victor, V.M., Guayerbas, N., Puerto, M., De la Fuente, M., 2001. Changes in the ascorbic acid levels of peritoneal lymphocytes and macrophages of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res.* 35 (6), 907–916.
- Vida, C., González, E.M., De la Fuente, M., 2014. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr. Pharm. Des.* 20 (29), 4656–4678.
- Villar del Fresno, A.M^a., 1999. Farmacognosia General. Editorial Síntesis: España.
- Wang, L., Lin, S.Q., He, Y.L., Liu, G., Wang, Z.Y., 2013. Protective effects of quercetin on cadmium induced cytotoxicity in primary cultures of rat proximal tubular cells. *Biomed Environ Sci.* 26 (4), 258–267.
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., Gao, Y., 2016. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 56, 21–38.
- Waris, G., Ahsan, H., 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* 5, 14.
- Weiss, S.J., 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320(6), 365–376.

- Welsch, U., Sobotta, J., 2008. Histología. (2ª Edición). Médica Panamericana: Buenos Aires.
- Wilms, L.C., Kleinjans, J.C., Moonen, E.J., Briedé, J.J., 2008. Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicol. In Vitro.* 22 (2), 301–307.
- Witmer, C.M.S., Jollow, D.J., Kalf, O.F., Kocis, J.J., Sipes, I.G., 1991. Biological Reactive Intermediates IV. Plenum Press: New York.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A.R., Miron, A., 2016. Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, S29–45.
- Yagi, A., Uemura, T., Okamura, N., Haraguchi, H., Imoto, T., Hashimoto, K., 1994. Antioxidative sulphated flavonoids in leaves of *Polygonum hydropiper*. *Phytochemistry.* 35 (4), 885–887.
- Yan, M., Liu, Z., Yang, H., Li, C., Chen, H., Liu, Y., Zhao, M., Zhu, Y. Luteolin decreases the UVA induced autophagy of human skin fibroblasts by scavenging ROS. *Mol. Med. Rep.* 14 (3), 1986–1992.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L., Huang, S.L., 2003. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(6), 1215–1222.
- Zangar, R.C., Davydor, D.R., Verma, S., 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199 (3), 316–331.
- Zhang, J., Yuan, K., Zhou, W.L., Zhou, J., Yang, P., 2011. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. *Pharmacogn. Mag.* 7 (25), 35–39.
- Zhang, Q., Cheng, G., Qiu, H., Zhu, L., Ren, Z., Zhao, W., Zhang, T., Liu, L., 2015. The p53-inducible gene 3 involved in flavonoid-induced cytotoxicity through the reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptotic pathway in human hepatoma cells. *Food Funct.* 6 (5), 1518–1525.
- Zhang, T., Wu, W., Li, D., Xu, T., Zhu, H., Pan, D., Zhu, S., Liu, Y., 2014. Anti-oxidant and anti-apoptotic effects of luteolin on mice peritoneal macrophages stimulated by angiotensin II. *Int. Immunopharmacol.* 20 (2), 346–351.
- Zhang, X., Boytner, R., Cabrera, J.L., Laursen, R., 2007. Identification of yellow dye types in some pre-columbian textiles. *Anal. Chem.* 70 (4), 1575–1582.
- Zhu, Q.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2000. Interaction between flavonoids and alpha-tocopherol in human low density lipoprotein. *J. Nutr. Biochem.* 11 (1), 14–21.



Capítulo 2: *Objetivos*



Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en cuanto a la leucotoxicidad relacionada a la generación de estrés oxidativo que manifiestan diversos antibióticos, se propone el estudio del posible daño oxidativo que podría generar GEN en leucocitos humanos por ser un antibiótico con importantes efectos secundarios en el hombre.

A su vez, tomando en consideración la actual problemática que plantea la multirresistencia de numerosas bacterias a los tratamientos antimicrobianos convencionales, y atendiendo a la limitada utilidad clínica de potentes antibióticos debido a sus importantes efectos tóxicos, se propone la búsqueda de principios activos obtenidos de especies vegetales autóctonas que puedan disminuir los efectos secundarios relacionados a un aumento de estrés oxidativo inducido por estos antibióticos, sin entorpecer su actividad antimicrobiana. De este modo, se lograría avanzar hacia una estrategia farmacológica que permita la revalorización de antibióticos actualmente de uso limitado, como GEN y CMP, y el mejoramiento en los tratamientos de aquellos de uso frecuente como CIP.

2.1 *Objetivo General*

- ✚ Contribuir al aprovechamiento de metabolitos secundarios bioactivos con potencial uso farmacéutico en diversos estados patológicos asociados con alteraciones del balance oxidativo.

2.2 *Objetivos Específicos*

- ✚ Estudiar las variaciones en el equilibrio redox generadas por GEN en leucocitos humanos evaluando la producción de ERO, la actividad de las defensas antioxidantes endógenas SOD y CAT, y el nivel de peroxidación lipídica, como un biomarcador de estrés oxidativo.
- ✚ Evaluar flavonoides de variada naturaleza química obtenidos de nuestra flora autóctona, como potenciales agentes protectores de los efectos secundarios no deseados que son inducidos por antibióticos y que se relacionan con un aumento de estrés oxidativo.
- ✚ Determinar el efecto de diversos flavonoides sobre las ERO inducidas por GEN en leucocitos humanos. Para aquellos flavonoides que mostraron una mayor actividad inhibitoria de las ERO generadas en este sistema, se estudiarán sus

efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas y la peroxidación lipídica.

- ✚ Evaluar *in vivo*, en un modelo murino, el efecto de aquellos flavonoides que demostraron actividad protectora frente al estrés oxidativo inducido por GEN, en leucocitos humanos *in vitro*, con el fin de poder determinar si es posible extrapolar el efecto observado en células sanguíneas aisladas a la circulación sistémica.

- ✚ Indagar el efecto de los flavonoides más activos frente a GEN, sobre la producción de ERO inducida por otros antibióticos como CIP y CMP en leucocitos humanos.

- ✚ Determinar el efecto de aquellos flavonoides que demostraron mayor actividad protectora frente a la producción de ERO, sobre la actividad antibacteriana de dichos fármacos en bacterias de diversos géneros.



Capítulo 3:
Extracción, purificación e identificación de
flavonoides



3.1. Flavonoides del género *Flaveria*: *F. bidentis*

3.1.1. Material vegetal

La especie *Flaveria bidentis* fue recolectada durante la época de floración en la localidad de Santa Rosa de Río Primero, provincia de Córdoba, Argentina. Se preparó una muestra de herbario del material vegetal completo (raíces, tallos, hojas y flores) el cual fue depositado en el herbario CORD del Museo Botánico de la Universidad Nacional de Córdoba e identificado por personal perteneciente al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET). El número de ejemplar asignado fue CORD 2813. Las partes aéreas fueron desecadas, a la sombra y con buena aireación, en nuestro laboratorio. Para continuar con el proceso de extracción, purificación e identificación de flavonoides se seleccionaron las hojas, las cuales fueron molidas manualmente.

3.1.2. Extracción y purificación de flavonoides

Se procedió a la extracción de los flavonoides de interés siguiendo el procedimiento de Cabrera y Juliani (1979) (Figura 3.1). Para ello 200 g de hojas fueron extraídas mediante lixiviación con dos solventes de baja polaridad, durante 24 h con cada uno de ellos, lo cual nos permitió eliminar ceras, grasas y pigmentos propios del material vegetal. Posteriormente con el residuo vegetal se llevó a cabo una maceración durante 24 h, obteniéndose un extracto hidroalcohólico, el cual fue filtrado y concentrado a presión reducida hasta 1/3 de su volumen mediante la utilización de un evaporador rotatorio. Al extracto concentrado se le adicionó igual volumen de etanol (EtOH) y se lo llevó a refrigeración durante 48 h, de esta forma se obtuvieron 7 g de un precipitado (PF) el cual fue posteriormente centrifugado.

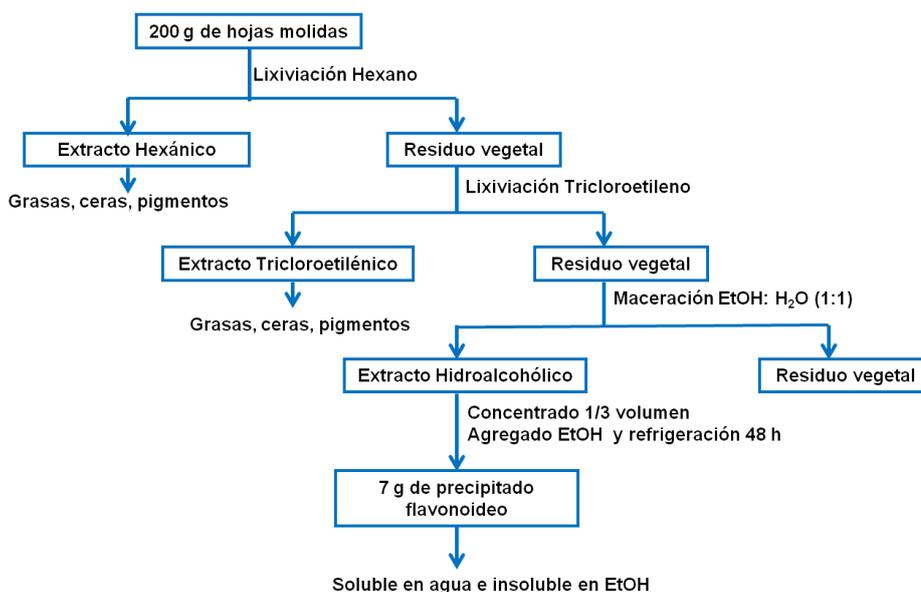


Figura. 3.1: Esquema general de extracción de flavonoides a partir de *F. bidentis*.

Con el objetivo de purificar los flavonoides de interés a partir del precipitado obtenido, se empleó Cromatografía de Exclusión Molecular, para ello, 200 mg de **PF** fue sujeto a Cromatografía en Columna (CC) utilizando Sephadex G-10 como fase estacionaria (FE), y H₂O como fase móvil (FM). Las fracciones obtenidas se testearon por Cromatografía en Papel (CP) Whatman 1 MM con la utilización de H₂O como FM y las mismas fueron reveladas con lámpara UV y vapores de NH₃.

A partir de la CC se obtuvieron 3 fracciones principales:

- **F1**, precipitado amarillo, que reveló por CP, la presencia de un solo componente, opaco a la combinación NH₃/UV. Del mismo se purificó **1 (112 mg)**.
- **F2**, precipitado amarillo, que por CP, mostró la presencia de un componente fluorescente a la combinación NH₃/UV, obteniendo a **2 (40 mg)**.
- **F3**, precipitado amarillo que por CP reveló ser una mezcla de distintos compuestos, del cual se obtuvieron 75 mg.

Por otro lado, 50 mg de **PF** se trató con ácido clorhídrico (HCl) 2,5 M; se calentó a reflujo durante 1 h y luego de enfriarse, se centrifugó a 3500 rpm. El precipitado se lavó con agua hasta pH neutro, se resuspendió en H₂O destilada y se particionó en ampolla de decantación con éter etílico. Tras la eliminación del solvente de la fase etérea, se obtuvieron **39 mg** de un precipitado amarillo que por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) conteniendo Sílica Gel 60/UV₂₅₄ como FE y utilizando CHCl₃ : Acetona : Ácido Fórmico (7,5:1,65:0,85) como FM, demostró ser un solo componente, al cual se lo denominó **3**.

Este procedimiento permitió obtener un mayor rendimiento de **3**, ya que el mismo es producido en *F. bidentis* a una concentración muy baja en relación con los demás constituyentes (Suárez y col., 1979).

3.1.3. Identificación de flavonoides

La identificación de los flavonoides aislados se realizó por Espectrofotometría UV y Cromatografía Líquida de Alta Performance (CLAP), comparando contra testigos y bibliografía específica (Cabrera, 1977; Cabrera y Juliani, 1976; Mabry y col., 1970; Pereyra de Santiago y Juliani, 1972).

🌀 Identificación del Compuesto 1

* Espectrofotometría UV

El espectro UV en EtOH:H₂O (1:1) del compuesto **1** mostró absorciones máximas a $\lambda_{\text{máx}}$, 270 (pico, p); 314 (p); 342 (shoulder, sh) nm, datos que fueron coincidentes con el testigo de 3,3',4',7 tetrasulfato de quercetina (**QTS**) (Figura 3.2).

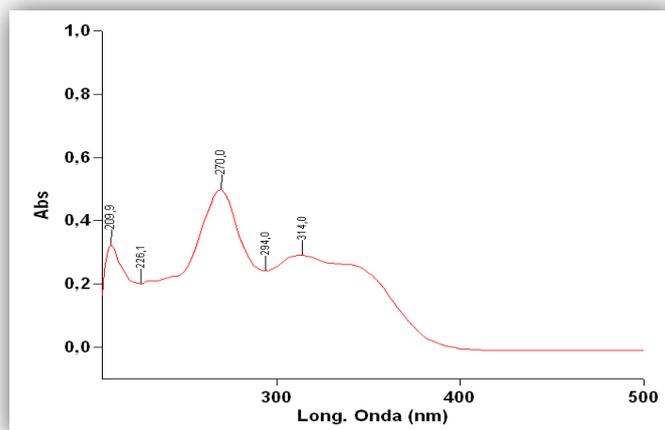


Figura 3.2: Espectro UV (EtOH:H₂O 1:1) del compuesto 1.

* Cromatografía Líquida de Alta Performance

Esta metodología involucró el empleo de una columna cromatográfica de CLAP en fase reversa Phenomenex Hipersil C18, 4,6 x 30 mm y detector espectrofotométrico a 290 nm. La elución se realizó por gradiente de FM utilizando como disolventes A: agua (ácido acético al 1 % v/v) y B: metanol (ácido acético al 1 % v/v). La programación de gradiente fue la siguiente: 10–35 % de B (10 min), 35 a 42 % B (15 min), 42 a 75 % de B (10 min), 75 % B (5 min), 75 a 10 % de B (5 min), 10 % B (5 min), a un caudal de 1,0 mL/min. La identificación fue realizada comparando los tiempos de retención (t_R) del compuesto de interés frente al testigo. El t_R del compuesto de interés **1** fue 1,965 min, coincidente con el del testigo **QTS**. El porcentaje de pureza de QTS se determinó en 90,0 % (Figura 3.3).

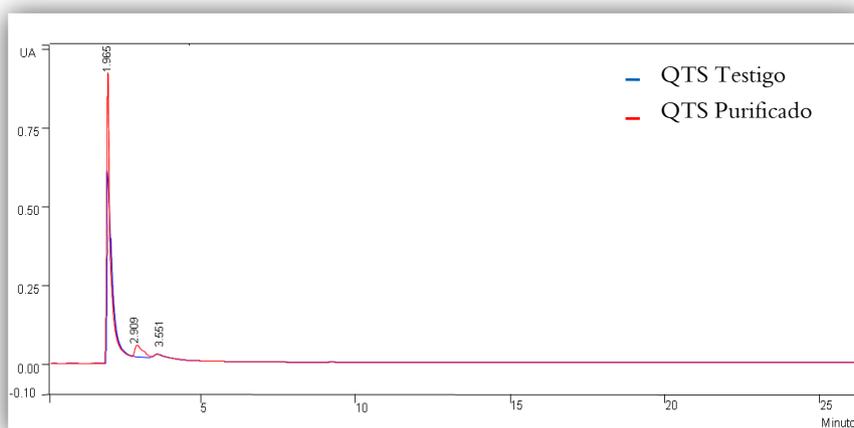


Figura 3.3: Cromatograma CLAP del compuesto 1, frente a testigo de QTS.

Estos datos, complementados con la determinación del valor de Relación de frente (R_f) coincidente con testigo y bibliografía mediante CP ($R_f=0,92$), permitieron identificar a **1** como **QTS** (Figura 3.4).

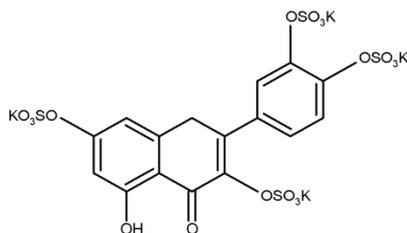


Figura 3.4: Estructura química de 3,3',4',7 tetrasulfato de quercetina (QTS).

Identificación del Compuesto 2

* Espectrofotometría UV

El espectro UV del compuesto **2** mostró absorciones máximas a $\lambda_{\text{máx}}$, 244 (p); 268 (p) y 346 (p) nm en EtOH:H₂O (1:1), siendo dichos valores coincidentes con el testigo de 3-acetil-7-3',4'trisulfato de quercetina (**ATS**) (Figura 3.5).

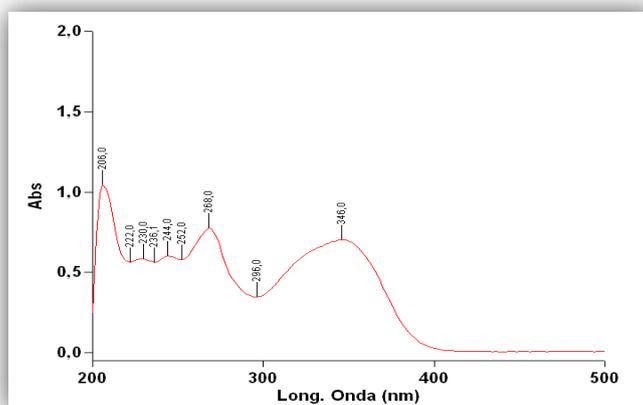


Figura 3.5: Espectro UV del compuesto 2 realizado en EtOH:H₂O (1:1).

* Cromatografía Líquida de Alta Performance

La metodología de CLAP, y la identificación, se realizaron bajo el procedimiento mencionado en la página 67. El t_R del compuesto **2** fue 3,471 min, acorde con el testigo de **ATS** (Figura 3.6). Su porcentaje de pureza se determinó en 96,2 %.

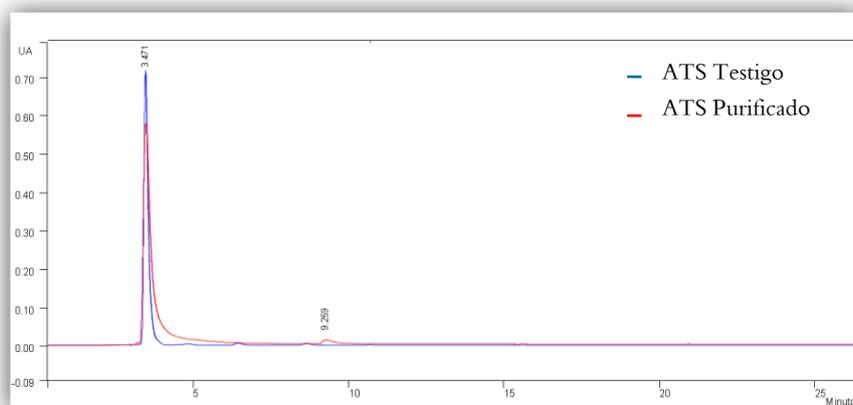


Figura 3.6: Cromatograma CLAP del compuesto 2, frente a testigo de ATS.

Los resultados obtenidos, adicionado al valor de Rf determinado por CP para el compuesto **2** (Rf=0,88), el cual fue coincidente con bibliografía y con el testigo, aseveran a dicho compuesto como **ATS** (Figura 3.7).

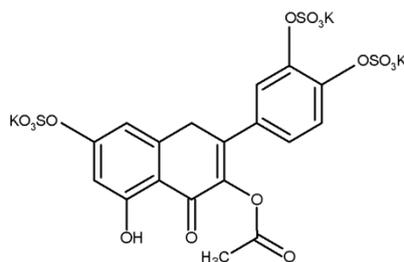


Figura 3.7: Estructura química de 3-acetil-7-3',4'-trisulfato de quercetina (ATS).

Identificación del Compuesto 3

* Espectrofotometría UV

Se realizó el espectro UV en EtOH del compuesto **3**, obtenido tras la hidrólisis ácida del **PF**. Las absorciones máximas del mismo fueron $\lambda_{\text{máx}}$, 255,9 (p); 267,2 (sh); 303 (sh); 373,9 (p) nm, correspondientes con el testigo de quercetina (**Q**) (Figura 3.8).

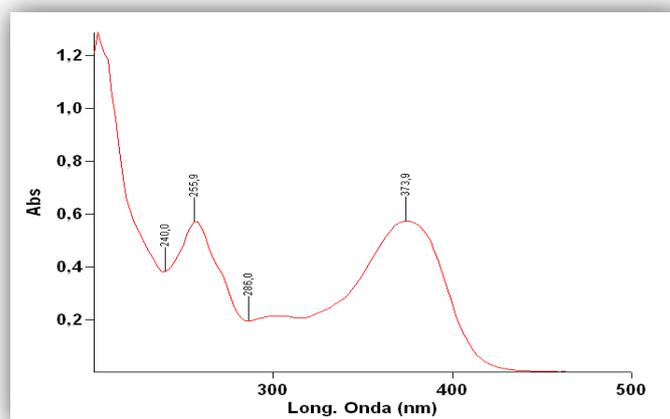


Figura 3.8: Espectro UV (EtOH) del compuesto **3**.

* Cromatografía Líquida de Alta Performance

Se llevó a cabo el mismo procedimiento mencionado en la página 67, en relación a la aplicación de la metodología de CLAP y la identificación del compuesto de interés. El t_R del compuesto **3** fue 5,247 min, coincidente con el testigo de **Q**, mostrando un porcentaje de pureza del 96,9 % (Figura 3.9).

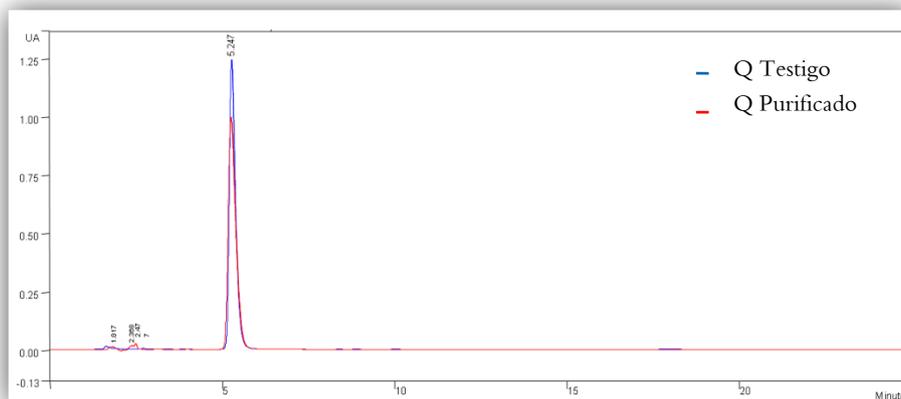


Figura 3.9: Cromatograma CLAP del compuesto 3, frente a testigo de Q.

Acorde a los resultados obtenidos, adicionado al valor de Rf determinado en CCD ($R_f=0,52$) coincidente con el testigo, se identificó a **3** como **Q** (Figura 3.10).

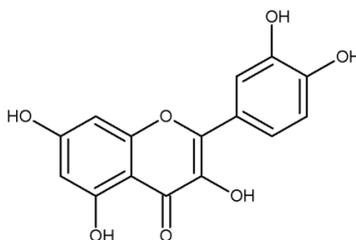


Figura 3.10: Estructura química de quercetina (Q).

3.2. Flavonoides del género *Prosopis*: *P. strombulifera* y *P. nigra*

3.2.1. Material vegetal

Los frutos de la especie *Prosopis strombulifera* var. *strombulifera* fueron recolectados a las afueras de la ciudad de Mendoza, provincia de Mendoza, Argentina. Se preparó una muestra de herbario del material vegetal completo (tallos, hojas y frutos) el cual fue depositado en el herbario CORD del Museo Botánico de la Universidad Nacional de Córdoba e identificado por personal perteneciente al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET). El número de ejemplar asignado fue CORD 1285. Los frutos fueron desecados, a la sombra y con buena aireación, en nuestro laboratorio y posteriormente molidos mediante un molino a cuchillas con tamiz n° 5. A continuación se procedió con la extracción, purificación e identificación de flavonoides.

La especie *Prosopis nigra* fue recolectada en Traslasierra, provincia de Córdoba, Argentina. Se preparó una muestra de herbario del material vegetal completo (tallos,

hojas, flores y frutos) el cual fue depositado en el herbario ACOR de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba e identificado por personal perteneciente al mismo herbario. El número de ejemplar asignado fue AMP (Colección Ana María Pontillo) 3484. Las partes aéreas fueron desecadas, a la sombra y con buena aireación, en nuestro laboratorio. Las hojas fueron el órgano seleccionado para continuar con el proceso de extracción, purificación e identificación de flavonoides.

3.2.2. Extracción y purificación de flavonoides

Para ambas especies vegetales se procedió de la siguiente manera: 500 g del órgano vegetal seleccionado (frutos para *P. strombilifera* y hojas para *P. nigra*) fue sometido a una extracción con EtOH mediante Soxhlet hasta agotar el material vegetal. Luego el solvente fue removido por evaporación a presión reducida con el fin de obtener el extracto crudo seco. Posteriormente, el mismo fue redissuelto con H₂O destilada a temperatura de ebullición y sometido a sucesivas particiones con solventes de polaridad creciente de modo que cada solvente extraerá distintos tipos de compuestos según la polaridad de los mismos (Figura 3.11) (Gianinetta y col, 1976).

Todos los extractos obtenidos fueron evaporados a presión reducida. Acorde a los flavonoides de interés para el presente estudio, para la especie *P. strombulifera* se seleccionó el Extracto Etéreo, del cual se obtuvieron 455 mg del mismo, mientras que para el caso de la especie *P. nigra*, se continuó trabajando con el Extracto de Acetato de Etilo, consiguiéndose 1,47 g del mismo.

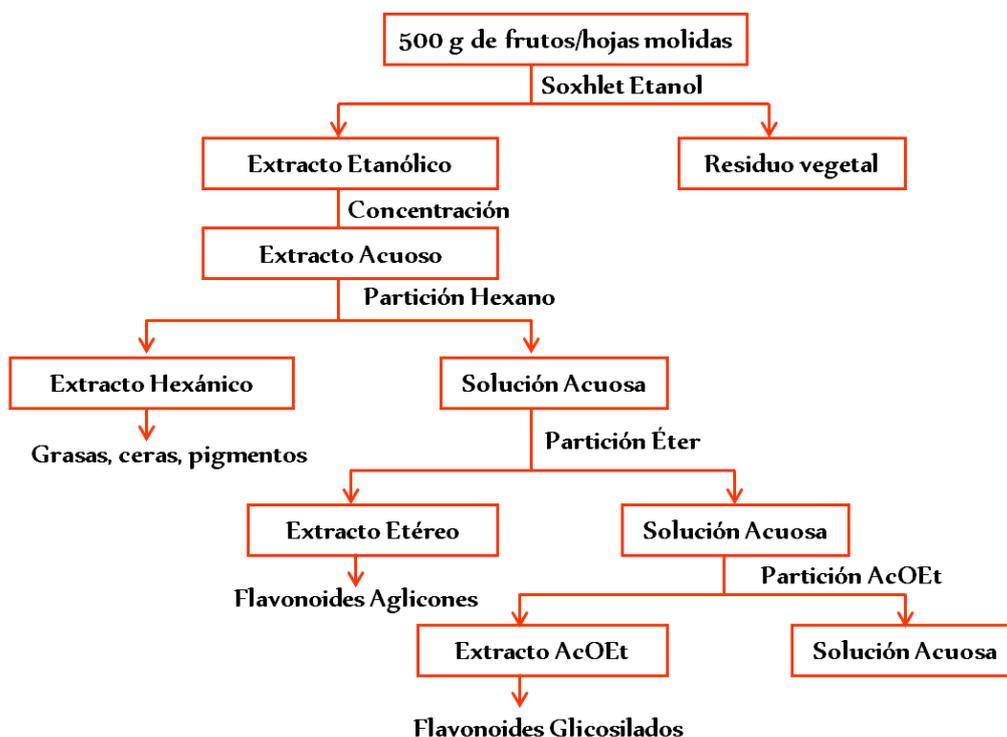


Figura 3.11: Esquema general de extracción a partir de especies del Género *Prosopis*.

Con el objetivo de llevar a cabo la purificación de flavonoides a partir de *Prosopis sp.*, el extracto etéreo obtenido de *P. strombulifera* var. *strombulifera* fue sometido a CP Preparativa Whatman 3 MM utilizando Ácido Acético 15 % como FM, las mismas fueron eluidas durante 4 días y posteriormente reveladas con lámpara UV y vapores de NH₃. Se obtuvieron así 9 manchas de las cuales se seleccionó la **M7** (53 mg), en base a los resultados del análisis de los rompimientos químicos de cada una de ellas, que fueron obtenidos mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR-EM). Así, M7 evidenciaba la presencia mayoritaria de luteolina, que posteriormente fue sometida a CC utilizando Sephadex LH-20 como FE y EtOH como FM (Cromatografía de Exclusión Molecular). Se colectaron fracciones de 3 ml que fueron combinadas, según el análisis de sus perfiles cromatográficos por CCD conteniendo Sílica Gel 60/UV₂₅₄ como FE y utilizando CHCl₃:Acetona:Ácido Fórmico (7,5:1,65:0,85) como FM. Se obtuvieron así cuatro fracciones de las cuales se seleccionó **F2**, que mostró un precipitado amarillo, el cual tras ser analizado por CCD reveló la presencia de un solo componente, opaco a la luz UV, y del que se obtuvieron **13 mg**, denominándose al mismo como **4**.

En cuanto a la purificación de flavonoides a partir de la especie *Prosopis nigra*, se realizó según la metodología de Gianinetto y col. (1976). Para ello, 147 mg del Extracto de Acetato de Etilo fue redissuelto en EtOH y sujeto a CC, utilizando como FE Celulosa Microcristalina y H₂O como FM. Se recogieron fracciones que fueron combinadas según sus perfiles cromatográficos tanto por CCD conteniendo Sílica Gel 60/UV₂₅₄ como FE y utilizando AcOEt : Ácido Fórmico : Ácido Acético : H₂O (10:1,1:1,1:2,7) como FM, como por CP Whatman 1 MM, con la utilización de ácido acético 15 % como FM.

Se obtuvieron 3 fracciones de interés:

- **F1**, precipitado amarillo, que por CCD y CP, mostró la presencia de un solo componente opaco a la luz UV, obteniendo al compuesto **5 (15 mg)**.
- **F2**, por CCD y CP resultó ser una mezcla de compuestos cuyo peso fue 19 mg.
- **F3**, precipitado amarillo, que reveló por CP y CCD, la presencia de un único componente fluorescente a la luz UV. Del mismo se obtuvo a **6 (26 mg)**.

3.2.3. Identificación de flavonoides

La identificación de los flavonoides aislados se realizó por Espectrofotometría UV y CLAP, comparando contra testigos y bibliografía específica (Mabry y col., 1970; Harborne y Mabry, 1982).

Identificación del Compuesto 4

* *Espectrofotometría UV*

El compuesto **4** obtenido de los frutos de especie *P. strombulifera* mostró un espectro UV en EtOH cuyas absorciones máximas fueron a $\lambda_{\text{máx}}$, 256 (p); 270 (p); 294 (sh) y 352 (p) nm, las cuales se correspondieron con el testigo de luteolina (**L**) (Figura 3.12).

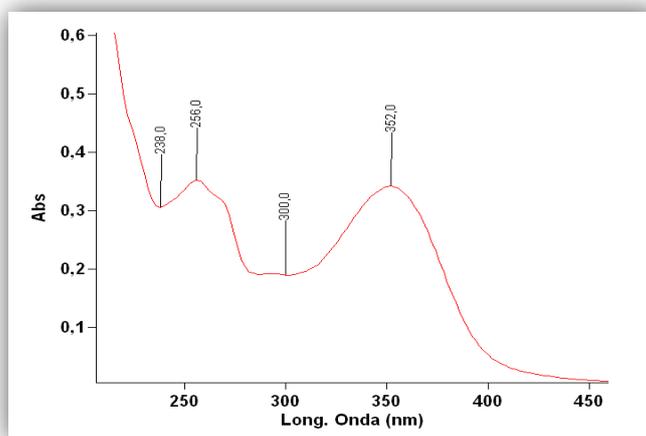


Figura 3.12: Espectro UV en EtOH del compuesto 4.

* *Cromatografía Líquida de Alta Performance*

La metodología y la identificación por CLAP se realizaron siguiendo el procedimiento mencionado en la página 67. El t_R del compuesto **4** fue 5,265 min, acorde con el del testigo de **L** (Figura 3.13). El porcentaje de pureza del mismo se determinó en 97,0 %.

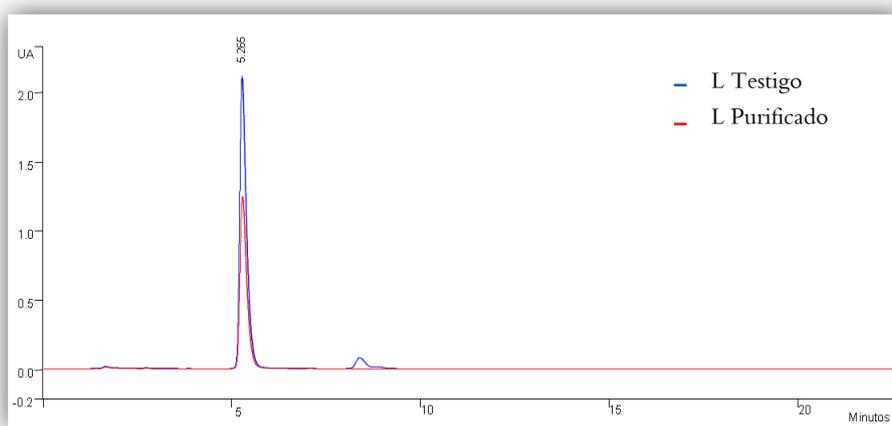


Figura 3.13: Cromatograma CLAP del compuesto 4, frente a testigo de **L**.

Los datos obtenidos para el compuesto **4**, del análisis de Espectrofotometría UV, CLAP y CLAP-EM permitieron identificarlo como **L** (Figura 3.14).

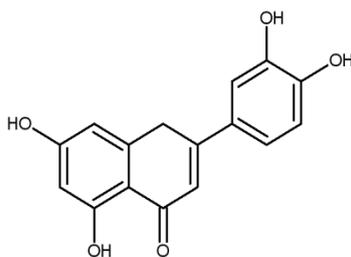


Figura 3.14: Estructura química de luteolina (L).

Identificación del Compuesto 5

Espectrofotometría UV

Se realizó el espectro UV en EtOH del compuesto 5, obtenido de *P. nigra*. Las absorciones máximas del mismo fueron $\lambda_{\text{máx}}$, 272 (p) y 336 (p) nm, correspondientes con el perfil y las absorciones obtenidas para el testigo de isovitexina (Iv) (Figura 3.15).

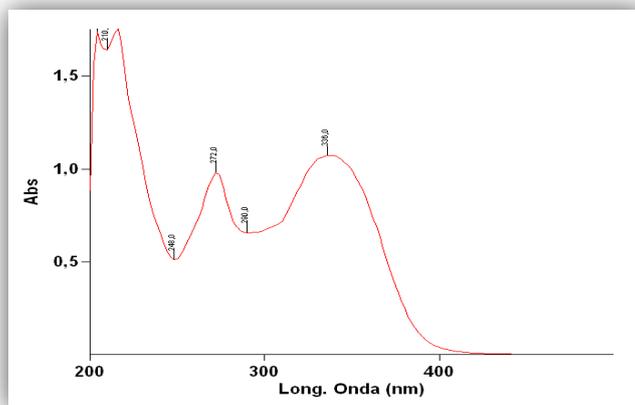


Figura 3.15: Espectro UV (EtOH) del compuesto 5.

* Cromatografía Líquida de Alta Performance

Se llevó a cabo el procedimiento mencionado en la página 67, en relación a la metodología de CLAP e identificación del compuesto de interés. El t_R de 5 fue 23,845 min, coincidente con el testigo de Iv, mostrando un porcentaje de pureza del 96,4 %.

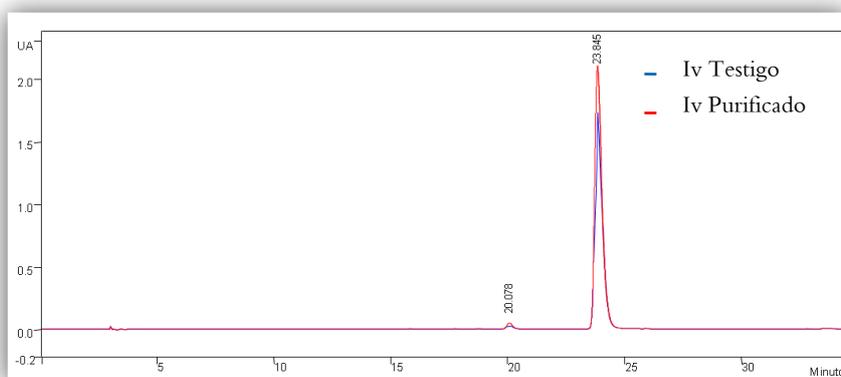


Figura 3.16: Cromatograma CLAP del compuesto 5, frente a testigo de Iv.

Los resultados obtenidos, junto a los valores de Rf determinados mediante CP y CCD para el compuesto **5** (Rf=0,61 y 0,60; respectivamente), ambos coincidentes con testigo y bibliografía, aseveran a dicho compuesto como **Iv** (Figura 3.17).

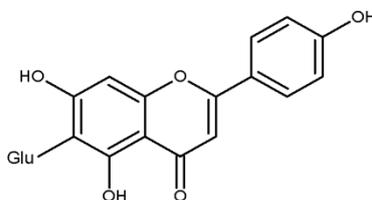


Figura 3.17: Estructura química de isovitexina (Iv).

Identificación del Compuesto 6

Espectrofotometría UV

El espectro UV del compuesto **6**, aislado de las hojas de *P. nigra*, mostró absorciones máximas a $\lambda_{\text{máx}}$, 270 (p); 302 (sh) y 340,1 (p) nm en EtOH siendo, tanto el perfil del especto como los valores obtenidos, coincidentes con el testigo de vitexina (**V**) (Figura 3.18).

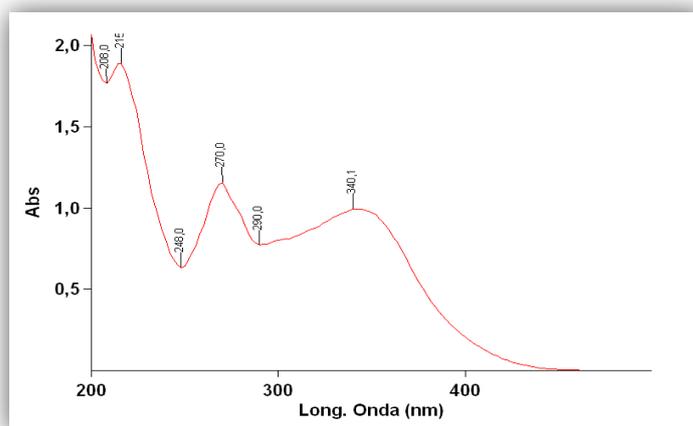


Figura 3.18: Espectro UV (EtOH) del compuesto 6.

* Cromatografía Líquida de Alta Performance

La metodología y la identificación mediante CLAP se realizaron siguiendo el mismo procedimiento mencionado en la página 67. El t_R del compuesto **6** fue 19,948 min, coincidente con el obtenido para el testigo de **V** (Figura 3.19). El porcentaje de pureza del mismo se determinó en 95,9 %.

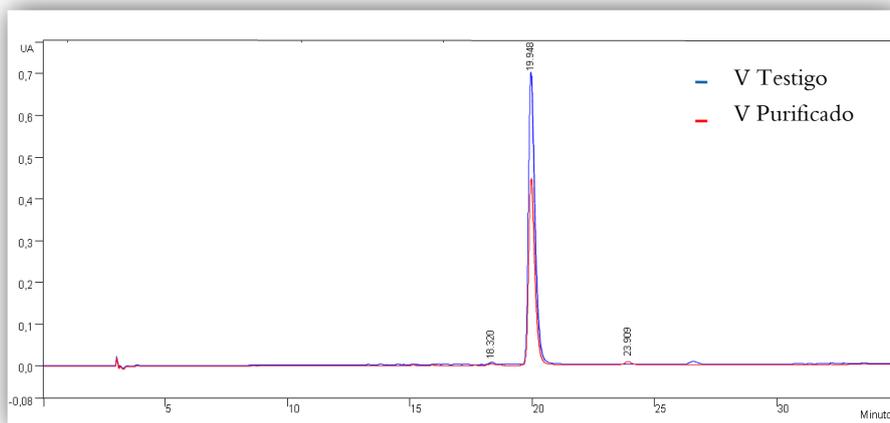


Figura 3.19: Cromatograma CLAP del compuesto 6, frente a testigo de V.

Acorde a los resultados obtenidos, complementado con los valores de Rf determinados en CP y CCD ($R_f=0,40$ y $0,75$; respectivamente) los cuales son coincidente con el testigo y bibliografía, se identificó al compuesto **6** como **V** (Figura 3.20).

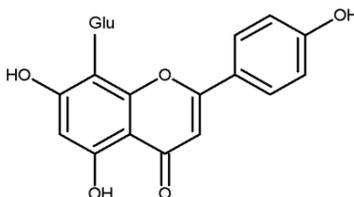


Figura 3.20: Estructura química de vitexina (V).

De este modo se obtuvieron seis flavonoides de variada naturaleza química: Un flavonol aglicón (**Q**) y dos de sus derivados sulfatados (**ATS** y **QTS**), una flavona aglicona (**L**) y dos flavonas C-glicosiladas las cuales son isómeros de posición (**V** e **IV**). Con los mismos se realizaron los estudios en cuanto a su efecto sobre el estrés oxidativo inducido por antibióticos, objeto de la presente tesis doctoral.

3.3. Bibliografía

- Cabrera, J.L., 1977. Flavonoides y Derivados Presentes en *Flaveria bidentis* (L) Otto Kuntze y *Flaveria bidentis* var. *angustifolia* O.K. (Flia. De las compuestas) (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1976. Quercetin-3 acetyl-7,3',4'-trisulphate from *Flaveria bidentis*. *Lloydia*. 39, 253-254.
- Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1979. Two new quercetin sulphates from *Flaveria bidentis*. *Phytochem*. 18, 510-511.

- Gianinetto, L.B., Cabrera, J.L., Oberti, J.C., Juliani, H.R., 1976. Flavonoids in genus *Prosopis* (Leguminosae) II. *Phytochem.* 15, 1098-2001.
- Harborne, J.B., Mabry, T.J. (Eds), 1982. The Flavonoids: Advances in Research. Chapman & Hall: London.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Systematic Identificaion of Flavonoids. Springel-Verlag: New York.
- Pereyra de Santiago, O.J., Juliani, H.R., 1972. Isolation of quercetin 3,7,3',4'-tetrasulphate from *Flaveria bidentis* L. Otto Kuntze. *Experientia.* 28(4), 380-381.
- Suárez, S.S., Cabrera, J.L., Juliani, H.R., 1979. Flavonoides en *Flaveria bidentis* (L.) O.K. y *Flaveria bidentis* var. *Angustifolia* O.K. (Compuestas). *Anales Asoc. Quím. Argent.* 67, 229-230.



Capítulo 4:
Efecto de Gentamicina sobre la producción de
ERO, defensas antioxidantes y un
biomarcador de estrés oxidativo en leucocitos
humanos



4.1. Introducción

Los antibióticos son una de las herramientas más importantes en la medicina moderna, ya que permiten hacer frente a infecciones producidas por diversos tipos de bacterias, que de otra forma podrían ser mortales para el ser humano. Normalmente los antibióticos presentan toxicidad selectiva, siendo muy superior para los organismos invasores que para los seres humanos que los hospedan, sin embargo éstos pueden producir, bajo ciertas condiciones, distintos efectos secundarios en las células del huésped. En este aspecto, se incluyen diversas alteraciones, tales como el daño celular por estrés oxidativo, el cual ha sido asociado con la toxicidad de numerosos antibióticos.

Ciprofloxacina y CMP, son dos antibióticos con los cuales se han realizado numerosos estudios que indican que algunos de los efectos secundarios producidos por ellos estarían relacionados a la capacidad de generar RL capaces que producir daño en células humanas, encontrándose reportes en leucocitos (Becerra y col., 2003; Páez y col., 2008), eritrocitos (Qin y Liu, 2013), sangre entera (Correa Salde y Albesa, 2009; Ray y col., 2006), fibroblastos (Hincal y col., 2003) y células madre hematopoyéticas de sangre de cordón neonatal humano (Holt y col., 1997).

Gentamicina, por su parte, es un antibiótico aminoglucósido, el cual ha sido utilizado con éxito durante décadas en el tratamiento de infecciones bacterianas principalmente Gram-negativas y que actualmente recuperó su popularidad debido a la resistencia generalizada a otras clases de antibióticos (Denamur y col., 2011). Sin embargo, la utilidad clínica de GEN está limitada por el desarrollo de efectos adversos, principalmente nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad y hepatotoxicidad aunque también se ha documentado toxicidad a nivel hematológico con eosinofilia, leucopenia, granulocitopenia y trombocitopenia (Sweetman, 2009). Aunque la patogénesis de los principales efectos secundarios de GEN todavía no está bien dilucidada, muchos estudios de investigación en ratas han sugerido que sus efectos tóxicos son comúnmente relacionados a la producción de ERO, alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidantes, y al aumento de la peroxidación de lípidos en tejidos específicos y sangre entera, sin estudios realizados directamente en leucocitos humanos (Ademiluyi y col., 2013; Al-Majed y col., 2002; Correa Salde, 2011; Yang y col., 2011). Tratándose de un antibiótico con alta incidencia de efectos secundarios indeseados, la dosificación debe ser bien controlada. Las dosis recomendadas en adultos es de 2 a 3 mg/kg/día distribuidos en dos o tres dosis diarias, mientras que para el caso de infecciones que ponen en riesgo la vida del paciente, la dosis puede aumentarse hasta 5 mg/kg/día. Los niveles normales de GEN en sangre a dosis terapéuticas se encuentran entre 5 y 10 µg/mL, debiéndose controlar y ajustar la dosis, en todos los regímenes de administración, para que estos niveles no superen el máximo de 12 µg/mL (McEvoy, 2009; NML, 2016; Sweetman, 2009).

Tanto leucocitos como eritrocitos han sido utilizados como modelo para la investigación de estrés oxidativo inducido por RL debido a varias razones: estas células están continuamente expuestas a altas tensiones de oxígeno, son incapaces de sustituir los componentes dañados, sus lípidos de membrana se componen en parte por cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados que son vulnerables a la peroxidación, y tienen sistemas de enzimas antioxidantes (Konyalioglu y Karamenderes, 2005).

Por otra parte, la regulación de la producción de ERO es importante en los leucocitos, ya que como se mencionó en el Capítulo 1, estas células desempeñan una importante función en la defensa del huésped contra agentes infecciosos mediante la producción de ERO ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , HClO , $^1\text{O}_2$), de enzimas hidrolíticas y proteolíticas, y de polipéptidos antimicrobianos para la destrucción del contenido del fagosoma, con la participación fundamental del $\text{O}_2^{\cdot-}$, que se genera por la activación de una NADPH oxidasa (Páez y col., 2008; Winterbourn y col., 2016). Sin embargo, además de su actividad microbicida, los leucocitos pueden también lesionar al huésped mediante reacciones inflamatorias y oxidativas que dañan y afectan la integridad del tejido y su función (Kaneider y col., 2006; Weiss, 1989), ya sea por la generación extracelular o la liberación de oxidantes que pueden dañar a las células vecinas, como por la generación intracelular de ERO que puede afectar la viabilidad de la propia célula e inducir la señalización de eventos pro-inflamatorios dependientes de NF- κ B (Becker y col., 2002).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y debido a las evidencias que demuestran que antibióticos como CIP y CMP, causan un desequilibrio de ERO en los leucocitos humanos induciendo estrés oxidativo en los mismos (Becerra y col., 2003; Páez y col., 2008), y además, considerando que la leucotoxicidad es un aspecto significativo de las consecuencias tóxicas de un antibiótico, es importante poder determinar el efecto de GEN en este tipo de células sanguíneas.

Para ello es necesario poder evaluar el estrés oxidativo tanto a nivel de producción de ERO, defensas antioxidantes endógenas (SOD, enzima considerada una defensa primaria ya que acelera la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ evitando la generación adicional de RL, y CAT enzima que colabora en la eliminación de H_2O_2 formado durante la reacción catalizada por la SOD) y un biomarcador de estrés oxidativo (específicamente peroxidación lipídica).

4.2. Objetivo

- ✚ Investigar el efecto de GEN sobre la producción de ERO, la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas SOD y CAT, y el nivel de peroxidación lipídica como biomarcador de estrés oxidativo, en leucocitos MN y PMN humanos.

4.3. Metodología

4.3.1. Obtención de leucocitos humanos: Mononucleares y Polimorfonucleares

Los leucocitos MN y PMN humanos se obtuvieron a partir de 20 mL de sangre heparinizada de donantes voluntarios sanos. La sangre obtenida por punción venosa se sedimentó con dextrán (Sigma) al 6 %, en una proporción de 1 mL por cada 3 mL de sangre entera durante 45 min a temperatura ambiente, separando el plasma rico en leucocitos, de los hematíes. Posteriormente, se procedió a realizar una separación por gradiente de densidad, para lo cual se colocó el plasma conteniendo leucocitos en un tubo con Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma) en una proporción de 3 mL de plasma por cada mL de Ficoll-Hypaque. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, lo cual permitió separar los leucocitos MN del remanente de células sanguíneas.

A continuación, con el fin de aislar los leucocitos PMN, se descartó el Ficoll-Hypaque y se adicionaron 5 mL de HBSS-albúmina 0,1 % mg/mL al pellet (conteniendo tanto eritrocitos como células PMN), se homogenizó para lavar dichas células y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. Luego de descartar el sobrenadante, se procedió a realizar la lisis hipotónica de los eritrocitos con agua destilada mezclando con pipeta automática durante 30 segundos y por último, tras el agregado de 4 mL de HBSS-albúmina 0,1 %, se centrifugó a 1500 rpm durante 20 min. Tanto el pellet obtenido (el cual contiene los leucocitos PMN) como las células MN aisladas previamente, se lavaron dos veces con HBSS-albúmina 0,1 % y se resuspendieron en 1 mL del mismo buffer (de Pablo, 1998).

Se llevó a cabo el recuento celular en cámara de Neubauer (Marienfeld) y se ajustó la suspensión a 10^6 células/mL.

4.3.2. Determinación de viabilidad celular en leucocitos humanos

A fin de estimar el porcentaje de células viables, los leucocitos aislados se contaron empleando el colorante vital Azul de Tripán. El principio básico de ésta tinción se basa en el hecho de que las células vivas tienen su membrana plasmática intacta por lo que pueden excluir a diversos productos químicos, incluyendo Azul de Tripán, mientras que las células muertas tienen invariablemente ruptura de las membranas, y por ende, no pueden excluir el colorante, por lo que se observan de color azul al microscopio (Crowley y col., 2016).

Los leucocitos (MN y PMN) se incubaron durante 1, 2 y 4 horas con distintas concentraciones de GEN (8, 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$), las cuales fueron preparadas por disolución de sulfato de gentamicina (Sigma) en buffer HBSS a la mayor concentración de trabajo, y posterior dilución para obtener las concentraciones menores. Dichas concentraciones se seleccionaron según una curva de producción de ERO vs. concentración del antibiótico, escogiendo aquellas en las que se obtuviera un importante incremento de ERO, atendiendo además a que en las mismas se encuentre incluida la concentración plasmática máxima alcanzada tras la administración de dosis

terapéuticas de este antibiótico. Posteriormente, se adicionó igual volumen de colorante Azul de Tripán (Sigma) al 0,02 % p/v, y se determinó la viabilidad celular mediante recuento en cámara de Neubauer, luego de 10 min de contacto entre la suspensión celular y el colorante. La muestra control se procesó sin el tratamiento con el antibiótico, calculandose el porcentaje (%) de viabilidad.

4.3.3. Determinación de ERO intracelulares mediante fluorescencia

La determinación de ERO intracelular se realizó mediante el ensayo de diclorofluoresceína. 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2 -DCFDA) es una sonda fluorogénica la cual difunde a través de la membrana plasmática al interior celular donde es hidrolizada por las esterasas intracelulares, que escinden los grupos acetatos, formando el compuesto no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂). Esta forma de-acetilada es susceptible a ser rápidamente oxidada en presencia de ERO, convirtiéndose en el producto 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente (Figura 4.1) (Brubacher y Bols, 2001).

Las suspensiones de leucocitos (10^6 células/mL) fueron incubadas con H_2 -DCFDA (Sigma) $10 \mu\text{M}$ a 37°C , en oscuridad y con agitación suave, durante 30 min, tras lo cual, la sonda fue removida mediante centrifugación a 2500 rpm durante 20 min y posterior resuspensión de las células en HBSS–albúmina 0,1 %. Los leucocitos fueron incubados con GEN (8, 128 and $256 \mu\text{g/mL}$) en una microplaca de 96 pocillos durante 30 min a 37°C al abrigo de la luz; HBSS–albúmina 0,1 % fue utilizado para las células control. La fluorescencia fue medida en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) mediante un Lector de Microplacas Multimodo (Synergy HT; Bio–tek Instruments, Inc.), durante 30 min en intervalos de 5 min. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 485 y 528 nm, respectivamente. La fluorescencia de fondo fue corregida mediante la inclusión de blancos en paralelo con leucocitos sin sonda. Los resultados fueron expresados en como porcentajes (%) de incremento de fluorescencia respecto a las células control sin tratamiento.

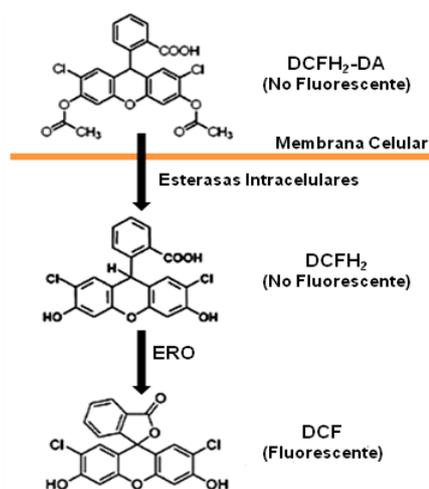


Figura 4.1: Esquema de reacción para la determinación de ERO mediante la sonda H_2 -DCFDA.

4.3.4. Determinación de la actividad Superóxido Dismutasa

En presencia de luz, oxígeno y metionina, la riboflavina es fotorreducida y pierde electrones disparando la generación de $O_2^{\bullet-}$. El nitroazul de tetrazolio (NBT) es un compuesto químico que en presencia de $O_2^{\bullet-}$ es reducido a azul de formazán el cual puede ser medido espectrofotométricamente. Debido a que la enzima SOD produce la dismutación de $O_2^{\bullet-}$, a mayor actividad SOD, menor es la reducción del NBT (Figura 4.2). De esta forma, se definió a una unidad de actividad SOD (U_{SOD}) como la cantidad de enzima requerida para disminuir en un 50 % la producción de NBT reducido (Beauchamp y Fridovich, 1971).

La mezcla de reacción está formada por NBT (Sigma) 75 μ M en DMSO, metionina (Sigma) 13 mM, riboflavina (Sigma) 2 μ M y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma) 100 nM, concentraciones finales, en una proporción 1:3:3:3 en buffer HBSS.

Los leucocitos MN y PMN fueron incubados con GEN (8, 128 and 256 μ g/mL) y HBSS–albúmina 0,1 % para el control, durante 1 hora a 37 °C en microplaca de 96 pocillos. Luego a cada pocillo conteniendo 100 μ L de la suspensión de leucocitos, previamente incubada, se le adicionó 130 μ L de la mezcla de reacción y se expuso la placa a luz fluorescente de 20 W durante 10 min para desencadenar la reacción. La absorbancia final se determinó a 560 nm en Lector de Absorbancia en Microplacas (Sunrise, Tecan Trading AG). Los resultados fueron expresados en Unidades Enzimáticas (UE/10⁶ células).

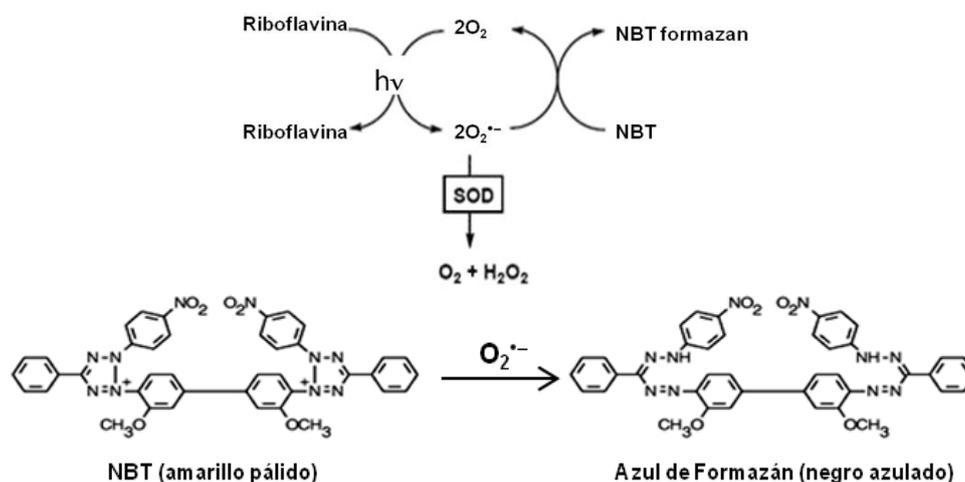


Figura 4.2: Esquema de reacción para la determinación de actividad SOD mediante la combinación riboflavina/ NBT.

4.3.5. Determinación de la actividad Catalasa

El dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en ácido acético es reducido a acetato crómico [$Cr(C_2H_3O_2)_3$] en presencia de H_2O_2 , con la formación de ácido perclórico como intermediario inestable. Debido a que la enzima CAT actúa transformando el H_2O_2 en

H₂O y O₂, a mayor actividad CAT menor producción de acetato crómico, el cual puede ser medido espectrofotométricamente (Figura 4.3). De este modo, se definió como una unidad de actividad CAT (U_{CAT}) a la cantidad de enzima requerida para disminuir un 50 % la producción de acetato crómico (Sinha, 1972; Thorsten, 2004).

Las suspensiones de leucocitos MN y PMN fueron incubadas con GEN (8, 128 and 256 µg/mL) durante 1 hora a 37 °C en microplaca de 96 pocillos. HBSS–albúmina 0,1 % fue utilizado para las muestras control. Luego del período de incubación, se adicionó a cada pocillo 40 µL de H₂O₂ (Pharafarm) 0,2 M y se incubó la placa a T° ambiente, al abrigo de la luz, durante 30 min; posterior a este tiempo, se agregaron 200 µL de K₂Cr₂O₇ (Anedra) al 2 % en ¼ de volumen de agua y ¾ de ácido acético glacial, y se determinó la absorbancia del producto coloreado a 570 nm, en Lector de Absorbancia en Microplacas, luego de 5 min de agregado el dicromato de potasio. Los resultados fueron expresados en UE/10⁶ células.

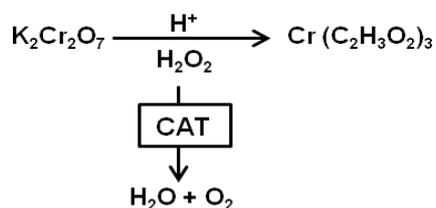


Figura 4.3: Esquema de la determinación de actividad CAT por dicromato de potasio.

4.3.6. Evaluación de la Peroxidación Lipídica

Los RL pueden atacar directamente a los ácidos grasos poliinsaturados de membrana e iniciar la reacción en cadena de peroxidación lipídica. Entre los diferentes aldehídos que pueden formarse durante este proceso, el más estudiado y cuantificado es el MDA. El MDA, formado por la descomposición de ácidos grasos poliinsaturados, en condiciones de bajo pH y alta temperatura, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar a un aducto MDA–TBA de color rojo que es detectable por espectrofotometría, teniendo su máximo de absorbancia a 535 nm (Figura 4.4). El contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se utiliza como indicador para la determinación del grado de peroxidación lipídica (Aiasa y col., 2013; Ohkawa y col., 1979; Wang y col., 2013).

Los leucocitos MN y PMN (10⁶ células/mL) fueron incubadas con GEN (8, 128 and 256 µg/mL) durante 4 horas a 37 °C; luego 200 µL de la suspensión celular fue mezclada con 350 µL de la mezcla de reacción formada por TCA–TBA–HCl [ácido tricloroacético (TCA, Fluka Biochemicals) 15 % p/v, ácido 2–tiobarbitúrico (TBA, Merck) 0,5 % p/v, ácido clorhídrico (HCl, Cicarelli) 0,25 N, en agua destilada] e incubada a 95 °C en baño termostatzado durante 45 min. El TCA precipita las proteínas, mientras que el TBA, en medio ácido, reacciona con el MDA formado. Luego de enfriar las muestras en baño de hielo, se adicionaron 350 µL de *n*-

butanol:piridina (15:1) agitando vigorosamente, con el fin de extraer el cromógeno formado, el cual es estable al menos 2 h a temperatura ambiente en esta mezcla de solventes, lo cual incrementa la sensibilidad del método. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min y se midió la absorbancia de la fase orgánica a 535 nm en Lector de Absorbancia en Microplacas.

Se realizó una curva de calibración con soluciones de 1,1,3,3 tetraetoxipropano (MDA, Sigma) en buffer HBSS a concentraciones de 0–10 nM y los resultados se expresaron en nM MDA/10⁶células.

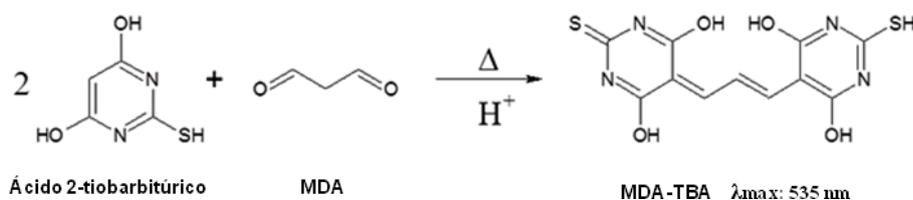


Figura 4.4: Determinación de peroxidación lipídica mediante TBARS.

4.3.7. Análisis Estadístico

Todos los valores se expresan como la media \pm D.S. Los resultados se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunett para determinar la significancia estadística entre los grupos utilizando GraphPad InsStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). $p < 0,05$ fue seleccionado como criterio de diferencia significativa.

4.4. Resultados y Discusión

4.4.1. Viabilidad celular de leucocitos humanos expuestos a GEN

A partir de sangre heparinizada de donantes voluntarios sanos se pudieron aislar dos poblaciones de leucocitos humanos: leucocitos MN (monocitos y linfocitos) con un % de viabilidad celular superior al 95 % y leucocitos PMN (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) con un % de viabilidad celular superior al 90 % (Figura 4.5).

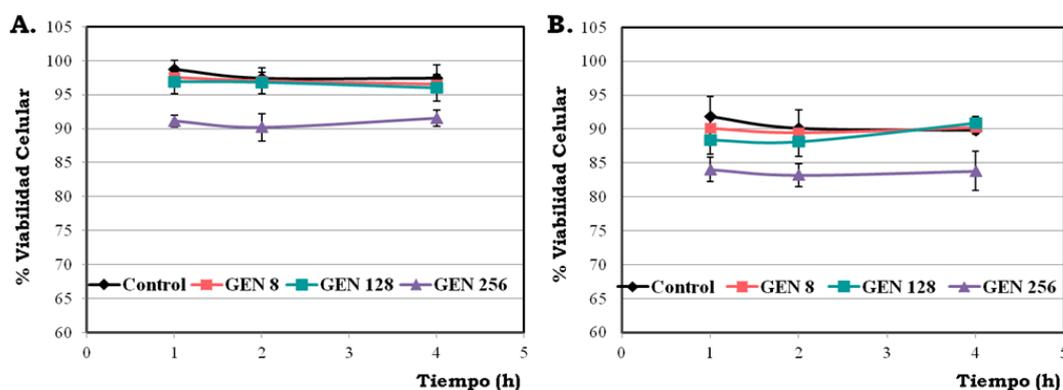


Figura 4.5: Porcentajes (%) de viabilidad celular en función del tiempo. A. leucocitos MN, B. leucocitos PMN.

En cuanto a los ensayos de viabilidad celular de los leucocitos expuestos a las distintas concentraciones de GEN (8, 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se pudo observar que a 8 y 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN, la viabilidad celular se mantuvo a valores similares a los del grupo control, el cual sólo se expuso a buffer HBSS–albúmina 0,1 %, sin embargo, a la mayor concentración del antibiótico evaluada (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la viabilidad decae alrededor de un 6 % con respecto al grupo control, manteniéndose a valores cercanos al 90 % en leucocitos MN y al 83 % en PMN.

4.4.2. Determinación de ERO intracelulares

En la primera serie de experimentos, se examinó la producción de ERO en función de la concentración de GEN en leucocitos MN y PMN. La exposición de leucocitos MN a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN (concentración plasmática a dosis terapéutica) no produjo un aumento en el nivel de ERO con respecto al grupo de leucocitos control no expuestos al antibiótico, sin embargo, en leucocitos PMN, el nivel de ERO se incrementó 2,1 veces en comparación con las células control ($112,8 \pm 5,5$ % de incremento de fluorescencia respecto al control).

Por otro lado, GEN tanto a 128 como 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incrementó significativamente la producción de ERO en ambos tipos de células. En MN, el contenido de ERO aumentó 2 veces respecto al control (% de incremento de fluorescencia respecto al control: $97,9 \pm 23,0$ % a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN y $106,5 \pm 20,7$ % a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN), mientras que en las células PMN, el nivel de ERO aumentó 4 veces (% de incremento de fluorescencia: $296,6 \pm 8,5$ % a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN y $297,0 \pm 24,1$ % a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN) en comparación con las células control (Figura 4.6).

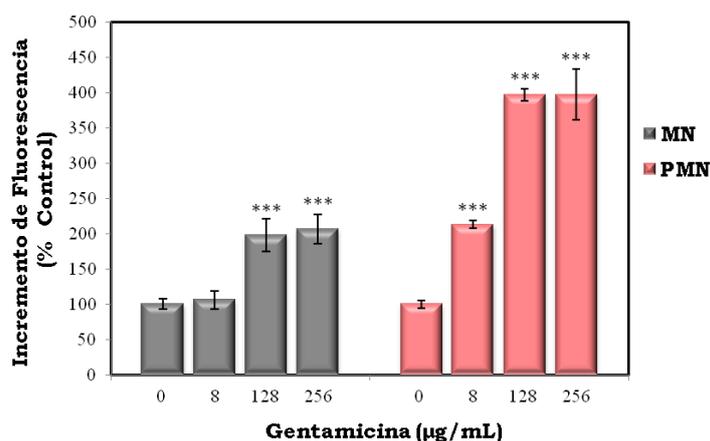


Figura 4.6: Efecto de GEN sobre la producción de ERO intracelulares en leucocitos MN y PMN humanos. *** $p < 0,001$ vs. control sin GEN.

De esta forma se observó un aumento en la producción de ERO intracelulares en leucocitos humanos, dependiente de la concentración, siendo mayor la producción de estas especies reactivas en los leucocitos PMN respecto a los MN. Esta mayor

capacidad de respuesta al estímulo de ERO por parte de las células PMN, en comparación con las MN, puede deberse a las diferencias que existen entre estos dos tipos celulares en cuanto al contenido y respuesta de las principales enzimas involucradas en el status oxidativo, tal como son la MPO y la NADPH oxidasa.

La MPO, enzima capaz de generar HClO, es la proteína más abundante que poseen los neutrófilos y aunque los monocitos también contienen gránulos azurófilos poseedores de esta enzima, ellos se encuentran en un menor número en estos últimos respecto de los neutrófilos (García Morales y col., 1998; Klebanoff, 2005). Por otra parte, está demostrado que la magnitud de actividad de la NADPH oxidasa es significativamente mayor en PMN que en MN (Kumar y col., 1991; Winterbourn y col., 2016), por lo que dada la capacidad de esta enzima de desencadenar la cascada de formación de ERO, esto podría explicar la mayor producción de dichas especies en PMN, sobre todo si se tiene en cuenta que existen reportes en células renales que manifiestan que GEN puede incrementar la actividad de esta enzima (Shin y col., 2014).

La evidencia, además, indica que la NADPH oxidasa de los monocitos se parece al complejo enzima NADPH oxidasa de neutrófilos, pero se regula de manera diferente. Algunos ejemplos de estas diferencias son que los neutrófilos, en la estimulación, producen un estallido respiratorio más inmediato (lo cual depende del estímulo), mientras los monocitos aumentan gradualmente la producción de $O_2^{\bullet-}$. Además, los agentes que activan la NADPH oxidasa de los neutrófilos no necesariamente activan la NADPH oxidasa en monocitos/macrófagos, lo que indica una regulación diferencial probablemente a través de una vía de señalización alternativa (Cathcart, 2004).

A su vez en cuanto a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas en la producción de ERO entre las concentraciones de 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$ de GEN para ambos tipos de células. Esta pérdida de la correlación lineal entre la producción de ERO y la concentración de GEN podría estar relacionada a lo informado por ciertos estudios que manifiestan una respuesta bifásica en la variación del porcentaje de producción de ERO por antibióticos como CIP y CMP, en los cuales la producción de ERO aumenta a bajas concentraciones del antibiótico y decrece a concentraciones altas, ya que concentraciones muy tóxicas de algunos antibióticos producen alteraciones significativas en las células con la consiguiente pérdida de correlación lineal entre la producción de ERO y la concentración de fármaco (Páez y col., 2008; Correa Salde y Albasa, 2009).

Además, si tenemos en cuenta los resultados de los ensayos de viabilidad celular podemos ver como a la mayor concentración de GEN, la viabilidad celular disminuye, dando un indicio de un probable efecto tóxico de este antibiótico a concentraciones elevadas.

4.4.3. Efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes endógenas

Los resultados obtenidos en cuanto a la producción de ERO intracelulares llevaron a explorar el comportamiento de dos de las principales enzimas endógenas reguladoras del estrés oxidativo a nivel celular: SOD y CAT. Al evaluar el efecto de GEN sobre la actividad de estas enzimas antioxidantes endógenas se observó un interesante comportamiento. En leucocitos MN, tras comparar con las células control, se observó que la concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ de GEN incrementó la actividad de ambas enzimas ($46,0 \pm 8,7\%$ SOD y $57,7 \pm 9,2\%$ CAT), mientras que a las concentraciones de 128 and 256 $\mu\text{g/mL}$ del antibiótico, la actividad SOD y CAT disminuye con respecto al control ($25,7 \pm 7,3\%$ y $53,7 \pm 20,1\%$ para SOD; $24,4 \pm 8,5\%$ y $28,5 \pm 9,1\%$ para CAT, respectivamente). Debido a este comportamiento dual dependiente de la concentración, se decidió adicionar una concentración del antibiótico menor ($0,25 \mu\text{g/mL}$) con lo cual se pudo corroborar este efecto bifásico en el que se observa un aumento de actividad enzimática a bajas concentraciones y una disminución a concentraciones mayores (Figura 4.7)

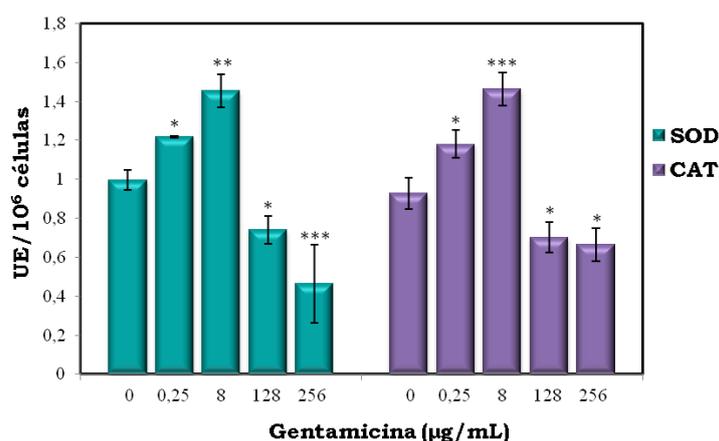


Figura 4.7: Efecto de GEN sobre la actividad SOD y CAT en leucocitos MN. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control sin GEN.

En cuanto al efecto en leucocitos PMN, se observó una disminución de la actividad SOD y CAT a todas las concentraciones del antibiótico evaluadas (0,25; 8; 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$) cuando son comparadas con el control, siendo los % de reducción $31,7 \pm 14,1\%$; $34,9 \pm 10,0\%$; $38,5 \pm 12,7\%$ y $50,2 \pm 9,8\%$, respectivamente para SOD y $16,4 \pm 2,0\%$; $16,0 \pm 3,9\%$; $29,4 \pm 6,4\%$ y $28,9 \pm 4,2\%$, respectivamente para CAT (Figura 4.8).

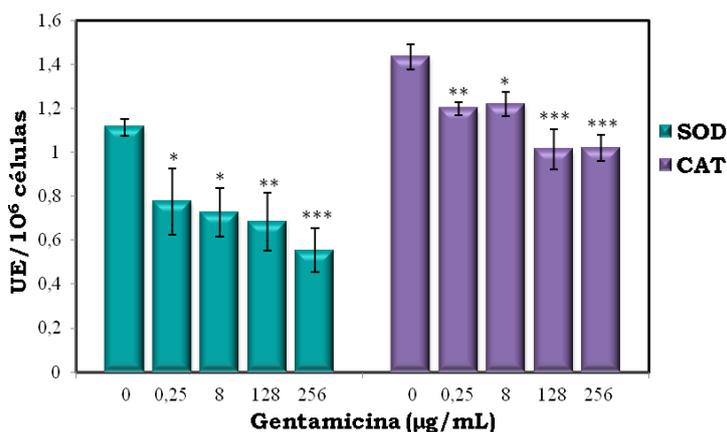


Figura 4.8: Efecto de GEN sobre la actividad SOD y CAT en leucocitos PMN. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control sin GEN.

SOD y CAT son dos de los mecanismos enzimáticos más importantes de defensa contra los efectos tóxicos de las ERO, ya que dichas enzimas son las encargadas de barrer el exceso de estas especies dañinas del organismo. Todo tejido y célula, aún en condiciones fisiológicamente estables, se expone a las ERO derivadas de la respiración celular, es por ello que las células control, es decir aquellas que solo fueron expuestas a buffer HBSS–albúmina, mostraron una actividad SOD y CAT *per se*. En cuanto a la variación en su actividad, se ha informado que el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas ocurre como una respuesta protectora para eliminar los RL reactivos (Celik y Suzek, 2009), mientras que se cree, que su disminución puede ser debido a un rápido agotamiento de las enzimas almacenadas en su afán de eliminar los RL generados en exceso durante el desarrollo de la toxicidad inducida por GEN (Ademiluyi y col., 2013).

En este sentido, teniendo en cuenta la actividad de estas enzimas antioxidantes en MN y correlacionando estos resultados con los obtenidos en cuanto a la producción de ERO, observamos que en la concentración de 8 µg/mL de GEN (concentración plasmática a dosis terapéuticas), en la cual no se observó un aumento significativo en la producción de ERO en el ensayo de fluorescencia, la actividad tanto de CAT como de SOD se incrementa. Este efecto podría explicarse como una respuesta de estas enzimas antioxidantes con el fin de contrarrestar el incremento de la producción de ERO generadas por GEN, lo cual daría como consecuencia la ausencia de un aumento de fluorescencia. Por el contrario, a mayores concentraciones del antibiótico en las que se observó un aumento en la producción de ERO en MN, la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas se ve disminuida debido a la producción excesiva de ERO que causaría un agotamiento de los antioxidantes endógenos. En cuanto a los leucocitos PMN, todas las concentraciones de GEN evaluadas demostraron un aumento significativo en la producción de ERO acompañado de una disminución de

la actividad de ambas enzimas antioxidantes demostrando la mayor toxicidad de este antibiótico en leucocitos PMN.

4.4.4. Evaluación de la peroxidación lipídica

El tercer punto a determinar a la hora de evaluar el status oxidativo de un sistema, es investigar biomarcadores de estrés oxidativo como lo es la peroxidación de lípidos, dado que nos brinda información referente a las consecuencias del ataque de las ERO sobre macromoléculas biológicas. En cuanto al efecto de GEN sobre la peroxidación lipídica en leucocitos humanos, se detectó, a las tres concentraciones evaluadas del antibiótico, una elevación significativa de los niveles de MDA en células MN y PMN en comparación con los leucocitos de control ($49,8 \pm 17,8 \%$; $85,1 \pm 14,7 \%$ y $91,3 \pm 10,9 \%$ en MN, y $92,6 \pm 20,2 \%$; $125,7 \pm 6,4 \%$ y $152,0 \pm 17,8 \%$ en PMN), siendo dicho incremento dependiente de la concentración de GEN, observándose un mayor efecto a la concentración del antibiótico más alta (Figura 4.9).

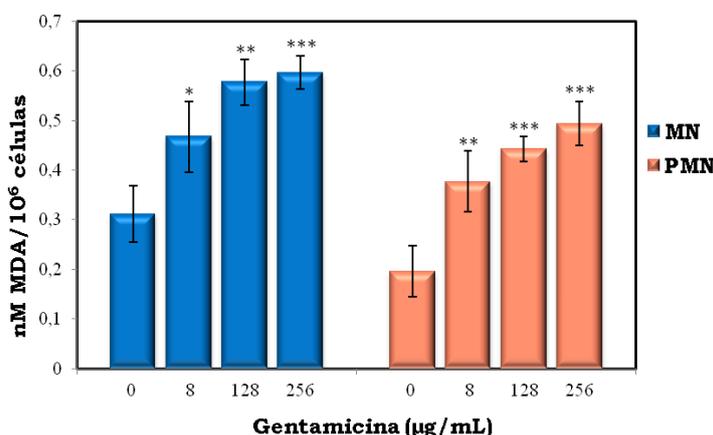


Figura 4.9: Efecto de GEN sobre la peroxidación lipídica en leucocitos humanos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control sin GEN.

El aumento en la producción de ERO, sumado a la actividad reducida de uno o más sistemas antioxidantes endógenos, conduce a un aumento en la peroxidación de lípidos. El incremento en los niveles de MDA, medido como TBARS, es indicativo de una disminución en el contenido de ácido graso poliinsaturado, el cual sirve como sustrato para el ataque de los RL, indicando de este modo un aumento en la oxidación de lípidos (Al-Majed y col., 2002). En la evaluación de la peroxidación lipídica en células sanguíneas expuestas a GEN, se observó un importante incremento en los niveles de MDA manifestando las consecuencias nocivas de las ERO generadas sobre estas macromoléculas. Cabe mencionar que si bien a la menor concentración de GEN se observaba, una activación de las enzimas antioxidantes endógenas, luego de 4 horas de incubación es muy probable que la capacidad de defensa de estas enzimas se vea sobrepasada, por lo cual se observa un aumento de la peroxidación de lípidos.

4.5. Conclusiones Parciales

Los resultados obtenidos indicarían que GEN es capaz de inducir un aumento en la producción de ERO en leucocitos MN y PMN, observándose una mayor capacidad de respuesta al estímulo de estas especies reactivas en células PMN, posiblemente debido a las diferencias existentes en los sistemas generadores de ERO presentes en estos tipos celulares (NADPH oxidasa y MPO).

En cuanto al efecto sobre las defensas antioxidantes endógenas, se observó una respuesta bifásica en la actividad de las enzimas SOD y CAT, en leucocitos MN, hecho dependiente de la concentración del estímulo, el cual ya fue descrito anteriormente para antibióticos como CIP y CMP. En este sentido se pudo observar que en células MN, la actividad de SOD y CAT aumentan con el fin de contrarrestar las ERO inducidas por GEN a concentraciones terapéuticas, mientras que a altas concentraciones del antibiótico la actividad de las enzimas antioxidantes se ve disminuida probablemente debido al aumento exacerbado de ERO que llevan a un agotamiento de la actividad enzimática. Por otra parte, en el caso de leucocitos PMN se observó una disminución de la actividad de las defensas antioxidantes endógenas a todas las concentraciones de GEN dado el gran incremento de ERO generado en estas células.

Por último, el aumento significativo de la peroxidación lipídica a todas las concentraciones evaluadas de GEN, tanto en leucocitos MN como PMN, daría un indicio de la capacidad de las ERO generadas por este antibiótico de sobrepasar los sistemas antioxidantes endógenos y generar efectos nocivos a nivel de macromoléculas biológicas.

Lo anteriormente expuesto permitiría demostrar la toxicidad inducida por GEN en leucocitos humanos, siendo esta toxicidad mayor en células PMN, ya que, a todas las concentraciones del antibiótico se observó un aumento exacerbado de ERO, disminución de las defensas antioxidantes endógenas y aumento de peroxidación lipídica, con valores superiores a los observados en células MN.

4.6. Bibliografía

- Ademiluyi, A.O., Oboh, G., Owoloye, T.R., Agbebi, O.J., 2013. Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (6), 470–475.
- Al-Majed, A.A., Mostafa, A.M., Al-Rikabi, A.C., Al-Shabanah, O.A., 2002. Protective effects of oral Arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 46 (5), 445–451.
- Aiassa, V., Albrecht, C., Bustos, P.S., Ortega, G., Eraso, A.J., Albesa, I., 2013. Nitrosylation: An adverse factor in Uremic Hemolytic Syndrome. Antitoxin effect of *Ziziphus mistol* Griseb. *Food Chem. Toxicol.* 56, 381–386.

- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44 (1), 276–287.
- Becerra, M.C., Eraso, A.J., Albesa I., 2003. Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdine in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. *Lumin.* 18 (6), 334–340.
- Becker, S., Soukup, J.M., Gallagher, J.E., 2002. Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages. *Toxicol. in Vitro.* 16 (3), 209–218.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidase: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87 (1), 245–313.
- Brubacher, J.L., Bols, N.C., 2001. Chemically de-acetylated 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Meth.* 251 (1–2), 81–91.
- Cathcart, M.K., 2004. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (1), 23–28.
- Celik, I., Suzek, H., 2009. Effects of subacute exposure of dichlorvos at sublethal dosages on erythrocyte and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (3), 905–908.
- Correa Salde, V.A., 2011. Efecto de fármacos a nivel del equilibrio de especies reactivas: consecuencias moleculares y celulares (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Correa Salde, V.A., Albesa, I., 2009. Reactive oxidant species and oxidation of protein and hemoglobin as biomarkers of susceptibility to stress caused by chloramphenicol. *Biomed. Pharmacother.* 63 (2), 100–104.
- Crowley, L.C., Marfell, B.J., Christensen, M.E., Waterhouse, N.J., 2016. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016 (7), pdb.prot087155.
- de Pablo, M.A., Alvarez, C., Gallego, A.M., Ortega, E., Pancorbo, P.L., Alvarez de Cienfuegos López, G., 1998. Cellular activity of murine phagocytes isolated from peripheral blood by a discontinuous gradient. *Folia Biol.* 44 (3), 117–121.
- Denamur, S., Tyteca, D., Marchand-brynaert, J., Bambeke, F.V., Tulkens, P.M., Courtoy, P.J., Mingeot-leclercq, M., 2011. Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free Radic. Biol. Med.* 51 (9), 1656–1665.
- García Morales, O.H., Pereira Roche, N., Flores Sánchez, R.M., 1998. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 17 (3): 190–197.
- Hincal, F., Gürbay, A., Favier, A., 2003. Biphasic response of ciprofloxacin in human fibroblast cell cultures. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 1 (4), 481–492.
- Holt, D.E., Ryder, T.A., Fairbairn, A., Hurley, R., Harvey, D., 1997. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: I. *In vitro* effects on cells in culture. *Hum. Exp. Toxicol.* 16 (10), 570–576.

- Kaneider, N.C., Leger, A.J., Kuliopulos, A., 2006. Therapeutic targeting of molecules involved in leukocyte–endothelial cell interactions. *FEBS J.* 273 (19), 4416–4424.
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77 (5), 598–625.
- Konyalioglu, S., Karamenderes, C., 2005. The protective effects of *Achillea* L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. *J. Ethnopharm.* 102 (2), 221–227.
- Kumar, V., Ganguly, N.K., Anand, I.S., Wahi, P.L., 1991. NADPH oxidase activity in the monocytes and neutrophils of patient with rheumatic fever. *Cardioscience.* 2 (2), 93–97.
- McEvoy, G.K. (Ed.), 2009. American Society of Health-System Pharmacists. AHFS Drug Information. The Society: USA.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95 (2), 351–358.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I., 2008. Chloramphenicol-induced oxidative stress in human neutrophils. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103(4), 349–353.
- Qin, P., Liu, R., 2013. Oxidative stress response of two fluoroquinolones with catalase and erythrocytes: a combined molecular and cellular study. *J. Hazard. Mater.* 252–253, 321–329.
- Ray, R.S., Agrawal, N., Misra, R.B., Farooq, M., Hans, R.K., 2006. Radiation-induced in vitro phototoxic potential of some fluoroquinolones. *Drug Chem. Toxicol.* 29(1), 25–38.
- Shin, H.S., Yu, M., Kim, M., Choi, H.S., Kang, D.H., 2014. Renoprotective effect of red ginseng in gentamicin-induced acute kidney injury. *Lab. Invest.* 94 (10), 1147–1060.
- Sinha, A.K., 1972. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.* 47 (2), 389–394.
- Sweetman, S.C. (Ed.), 2009. Martindale the complete drug reference. Pharmaceutical Press: London.
- Thorsten, C., 2004. Biochemical experiment: Colorimetric assay for enzyme activity. CR-Scientific LLC: USA.
- U.S. National Library of Medicine (NLM). Drug Information Portal. United States of America. Recuperado el 23 Septiembre de 2016 de <http://druginfo.nlm.nih.gov/drugportal/rn/1405-41-0>
- Wang, L., Lin, S.Q., He, Y.L., Liu, G., Wang, Z.Y., 2013. Protective effects of quercetin on cadmium induced cytotoxicity in primary cultures of rat proximal tubular cells. *Biomed Environ Sci.* 26 (4), 258–267.
- Weiss, S.J., 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320(6), 365–376.
- Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., Hampton, M.B., 2016. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Ann. Rev. Biochem.* 85, 765–792.
- Yang, T.H., Young, Y.H., Liu, S.H., 2011. EGb 761 (*Ginkgo biloba*) protects cochlear hair cells against ototoxicity induced by gentamicin via reducing reactive oxygen species and nitric oxide-related apoptosis. *J. Nutr. Biochem.* 22 (9): 886–894.



Capítulo 5:
Efecto de flavonoides sobre el estrés oxidativo
inducido por Gentamicina en leucocitos
humanos in vitro



5.1. Introducción

La naturaleza es una fuente inagotable de especies vegetales con potencial uso farmacológico y como tal, ha sido explotada desde los inicios de la humanidad en la búsqueda permanente de productos capaces de combatir distintas enfermedades. Todas las civilizaciones, desde las más atrasadas hasta las más avanzadas han visto en la naturaleza, y particularmente en las plantas, la fuente primaria de una vida saludable.

Dado los avances en la producción de drogas derivadas de la síntesis orgánica, el uso de los productos naturales como fuente de nuevos fármacos, fue decayendo con el paso del tiempo, sin embargo, debido a la enorme variabilidad química que estos presentan, actualmente se ha visto un creciente interés por los metabolitos secundarios obtenidos de distintas especies vegetales con potencial uso farmacéutico, ya sea para ser utilizados por la propia actividad farmacológica que ellos puedan tener, así como también, para prevenir o evitar distintos efectos secundarios generados por fármacos ya conocidos y utilizados en la clínica (Bilgin y col, 2016; Eugenio-Pérez y col., 2016; Fu y col, 2016; Parlakpınar y col, 2005; Vacca y col, 2016; Xiao y col., 2016; Zhao y col., 2012).

Los flavonoides son un grupo importante de metabolitos secundarios polifenólicos derivados de especies vegetales, cuyo interés radica en su potencial actividad antioxidante, dada principalmente por su acción directa como scavenger o atrapadores de RL y/o por su capacidad de quelar metales, inhibiendo de este modo distintas reacciones oxidativas (Amić y col, 2007; Shahidi y Ambigaipalan, 2015). En el desarrollo de esta tesis doctoral, seis flavonoides de variada naturaleza química fueron aislados a partir de especies vegetales pertenecientes a los géneros *Flaveria* y *Prosopis*, ellos son: **Q**, un flavonol de tipo aglicón; **ATS** y **QTS**, los cuales son dos derivados sulfatados de quercetina; **L**, una flavona de tipo aglicona, y **V** e **Iv**, dos flavonas C-glicosiladas derivadas de apigenina, las cuales además son isómeros de posición.

Un importante número de investigaciones científicas se han abocado a la búsqueda de distintos compuestos químicos que permitan disminuir los efectos secundarios inducidos por diversos fármacos, entre ellos numerosos antibióticos. En las últimas décadas, diversos estudios se han llevado a cabo con GEN y numerosas intervenciones farmacológicas han demostrado ser capaces de prevenir el estrés oxidativo inducido por este antibiótico (Balakumar y col., 2010). En este sentido, el uso de productos naturales como fuentes para el descubrimiento de nuevas drogas y el tratamiento de enfermedades han atraído la atención debido a su capacidad antioxidante, evaluándose el efecto de muchos de ellos con el fin de proteger contra la toxicidad generada por GEN en distintos órganos específicos (Balakumar y col., 2010; Maldonado y col., 2003; Moreira y col., 2014; Noorani y col., 2011; Parlakpınar y col., 2005; Yang y col., 2011).

Por lo tanto, dada la capacidad de GEN de inducir estrés oxidativo en leucocitos humanos, demostrada en la presente tesis doctoral, y debido a las importantes

consecuencias que implica para el organismo un desbalance oxidativo a nivel sistémico, se plantea la búsqueda de compuestos naturales, particularmente flavonoides con capacidad antioxidantes, que puedan neutralizar los efectos tóxicos relacionados a un incremento de estrés oxidativo inducido por GEN en dichas células, con el fin de lograr la optimización de las terapias antimicrobianas con este fármaco.

5.2. Objetivos

- ✚ Evaluar el efecto de flavonoides de variada naturaleza química obtenidos de nuestra flora autóctona sobre la producción de ERO inducida por GEN en leucocitos MN y PMN humanos.
- ✚ Determinar el efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas SOD y CAT, y la peroxidación lipídica de aquellos flavonoides que demuestren efecto inhibitorio sobre la producción de ERO, en leucocitos humanos expuestos a GEN.

5.3. Metodología

5.3.1. Obtención de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares humanos. Determinación de viabilidad celular

La obtención de leucocitos humanos se realizó siguiendo la metodología desarrollada en el Capítulo 4. De igual modo que con GEN, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular empleando el colorante vital Azul de Tripán, con las concentraciones máximas (250 μM) de cada uno de los flavonoides aislados, determinándose un % de viabilidad superior al 95 % para leucocitos MN y superior al 90 % para leucocitos PMN, en todos los casos.

5.3.2. Determinación de ERO intracelulares mediante fluorescencia

La determinación de la producción de ERO intracelular se realizó siguiendo la metodología desarrollada en el Capítulo 4. Para ello las suspensiones de leucocitos (10^6 células/mL) se incubaron con GEN (8, 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los distintos flavonoides (10, 50 y 250 μM) durante 30 min a 37 °C al abrigo de la luz; HBSS–albúmina 0,1 % fue utilizado para el control. La fluorescencia se midió durante 30 min en intervalos de 5 min, los resultados se presentan como curvas de Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) en función del tiempo. A su vez, se calcularon los porcentajes de inhibición de ERO de cada flavonoide a las distintas concentraciones de GEN ($\text{URF}_{\text{muestra}}$), teniendo en cuenta los valores de URF de las células control ($\text{URF}_{\text{control}}$) y de las

células expuestas solamente al antibiótico ($URF_{\text{antibiótico}}$), al minuto 30 de la medición. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{URF_{\text{muestra}} - URF_{\text{control}}}{URF_{\text{antibiótico}} - URF_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Adicionalmente, con el fin de evaluar el efecto concentración-respuesta de cada uno de los flavonoides estudiados, las células se trataron de la misma forma como se describe anteriormente utilizando cinco concentraciones distintas para cada flavonoide, las cuales se seleccionaron con el fin de cubrir todo el rango de inhibición (0-100 %) a la concentración media de GEN (128 $\mu\text{g/mL}$), dado que a la misma se obtuvo una importante producción de ERO sin alteraciones en la viabilidad celular (Capítulo 4, páginas 87 y 88). Los valores de CI_{50} (concentración del flavonoide capaz de inhibir el 50 % de la producción de ERO) se estimaron utilizando el programa informático OriginPro® 8 (Northampton, MA) y los mismos fueron comparados con el valor de CI_{50} del inhibidor de referencia (vitamina C).

5.3.3. Determinación de la actividad Superóxido Dismutasa y Catalasa

Para la determinación del efecto de aquellos flavonoides activos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas se llevó a cabo la metodología desarrollada en el Capítulo 4. Las suspensiones de leucocitos MN y PMN se incubaron con GEN (8, 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$) y los flavonoides activos a tres concentraciones distintas, las cuales se seleccionaron según el valor de CI_{50} de cada uno de ellos, determinada en el ensayo de fluorescencia para cada tipo celular, con el fin de abarcar un rango de inhibición de ERO entre el 10 y el 90 %. HBSS-albúmina 0,1 % fue utilizado para las muestras control. Las absorbancias de cada producto coloreado formado se determinaron a las longitudes de onda correspondientes para cada enzima, y los resultados se expresaron en Unidades Enzimáticas/ 10^6 células, siendo dichas Unidades UE, U_{SOD} ó U_{CAT} según el caso.

5.3.4. Evaluación de la Peroxidación Lipídica

La cuantificación de MDA como indicador para la determinación del grado de peroxidación lipídica se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4. De la misma forma que para los ensayos de actividad enzimática, los leucocitos MN y PMN se incubaron con GEN (8, 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$) y los flavonoides activos, a las tres concentraciones seleccionadas según el valor de CI_{50} de cada uno de ellos para cada tipo de leucocitos. HBSS-albúmina 0,1 % fue utilizado para las muestras control. Los resultados se expresaron en nM MDA/ 10^6 células aplicando la ecuación de la curva de calibración realizada con MDA.

5.3.5. Análisis Estadístico

Todos los valores se expresan como la media \pm D.S. Los resultados se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunett o Tukey para comparaciones múltiples utilizando GraphPad InsStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). $p < 0,05$ fue seleccionado como criterio de diferencia significativa.

5.4. Resultados y Discusión

5.4.1. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos mononucleares humanos

En la primera serie de experimentos se determinaron las curvas de inhibición de la producción de ERO inducidas por GEN, en leucocitos MN humanos, para todos los flavonoides aislados a tres concentraciones: 10, 50 y 250 μM . A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de ellos.

3,3',4',7 tetrasulfato de quercetina

A una concentración de GEN de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentración a la cual dicho antibiótico no genera un aumento significativo en el nivel de ERO en leucocitos MN), sólo la mayor concentración del flavonoide QTS provocó una leve disminución de las ERO intracelulares por debajo del nivel basal, mientras que las concentraciones de 10 y 50 μM de QTS mantuvieron los niveles de estas especies reactivas similares a las células control. Por otra parte, a las concentraciones de 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico, QTS manifestó un importante efecto inhibitorio de la producción de ERO dependiente de la concentración, alcanzando valores cercanos al basal a la máxima concentración evaluada del flavonoide (Figura 5.1).

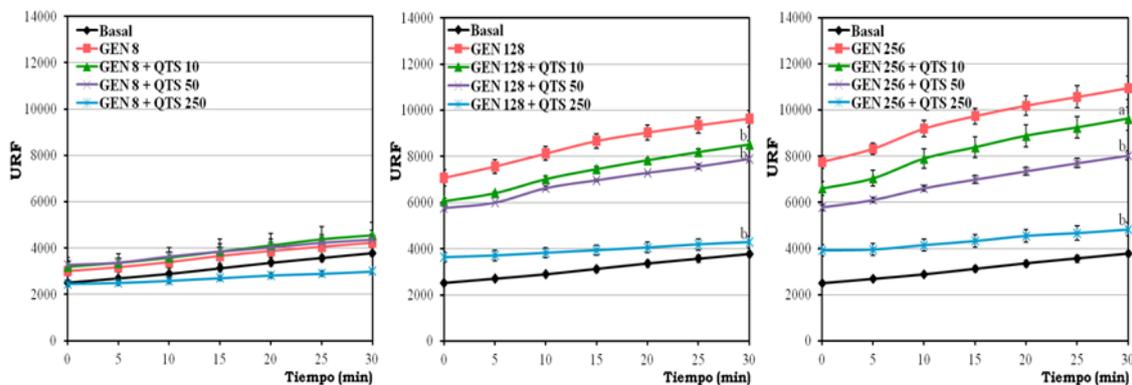


Figura 5.1: Efecto de QTS sobre la producción de ERO mediada por GEN en leucocitos MN humanos. ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,001$ vs. GEN.

Los porcentajes de inhibición fueron calculados sólo para las concentraciones de 128 y 256 µg/mL de GEN, dado que a 8 µg/mL el antibiótico no induce un aumento de las ERO en estas células. Los valores obtenidos demostraron el marcado efecto concentración-dependiente de la actividad inhibitoria generada por QTS, alcanzando porcentajes de inhibición cercanos al 100 % a una concentración de 250 µM del flavonoide, siendo dichos valores $95,4 \pm 4,2$ % a 128 µg/mL de GEN y $85,4 \pm 4,0$ % de inhibición para GEN a 256 µg/mL (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Porcentajes de inhibición de QTS sobre la producción de ERO mediada por GEN en leucocitos MN humanos. ^a $p < 0,01$ vs. 50 µM; ^b $p < 0,001$ vs. 250 µM.

QTS (µM)	% Inhibición de producción de ERO		
	8	GEN (µg/mL)	
		128	256
10	---	$19,0 \pm 2,6^{ab}$	$18,6 \pm 7,1^{ab}$
50	---	$29,9 \pm 1,3^b$	$40,8 \pm 2,9^b$
250	---	$95,4 \pm 4,2$	$85,4 \pm 4,0$

Por lo tanto, QTS manifestó un importante efecto inhibitorio de las ERO inducidas por GEN, logrando alcanzar valores máximos de inhibición superiores al 85 %.

3-acetil-7-3',4'-trisulfato de quercetina

A todas las concentraciones de GEN evaluadas, ATS produjo un incremento en la producción de ERO. A la concentración de 8 µg/mL de GEN, se observó un incremento cercano al 50 % en la producción de especies reactivas respecto del nivel basal a las tres concentraciones del flavonoide ($50,5 \pm 2,5$ % a 10 µM, $53,6 \pm 9,8$ % a 50 µM y $47,2 \pm 1,4$ % a 250 µM del flavonoide). Un efecto similar se observó a las concentraciones de 128 y 256 µg/mL de GEN, en las cuales nuevamente ocurrió un incremento de la producción de ERO por parte de ATS, siendo en este caso superior al nivel de especies reactivas producidas por GEN, con valores cercanos al 30 % por encima del valor obtenido con GEN a 128 µg/mL ($25,0 \pm 2,1$ % a 10 µM; $34,3 \pm 8,7$ % a 50 µM y $29,2 \pm 1,4$ % a 250 µM de ATS) y cercanos al 20 % por encima del nivel de especies reactivas generadas por GEN a 256 µg/mL ($17,8 \pm 3,5$ % a 10 µM, $21,2 \pm 6,9$ % a 50 µM y $23,1 \pm 2,9$ % a 250 µM del flavonoide). No hubo diferencias significativas en la producción de ERO inducida por el flavonoide entre las tres concentraciones de ATS (Figura 5.2).

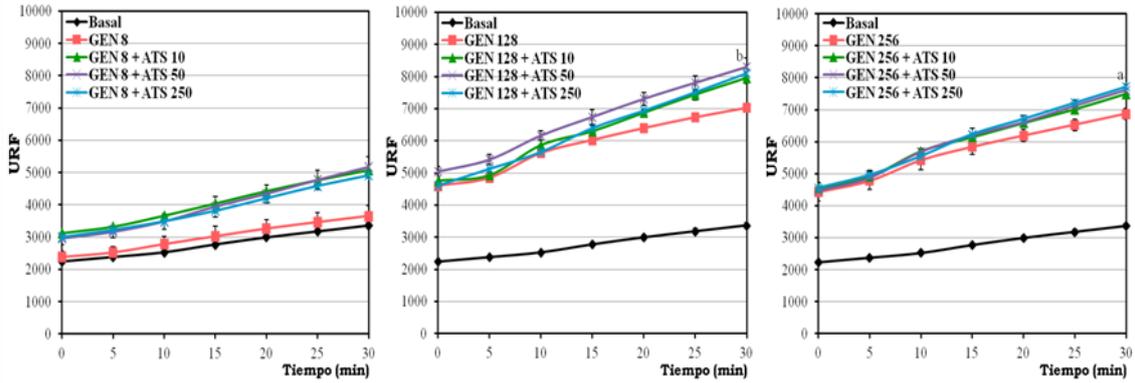


Figura 5.2: Producción de ERO en leucocitos MN humanos expuestos a la combinación de GEN y ATS. ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,001$ vs. GEN.

Es decir, que en el caso de ATS se vió un efecto contrario al esperado, ya que se observó para todas las concentraciones evaluadas un leve efecto pro-oxidante del mismo.

3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona - quercetina

Quercetina, el flavonol aglicón del cual derivan los dos flavonoides antes mencionados, manifestó un potente efecto inhibitorio de la producción de ERO a sus tres concentraciones evaluadas (10, 50 y 250 μM), observándose una disminución del nivel de estas especies reactivas por debajo del basal (control) en todos los casos (Figura 5.3).

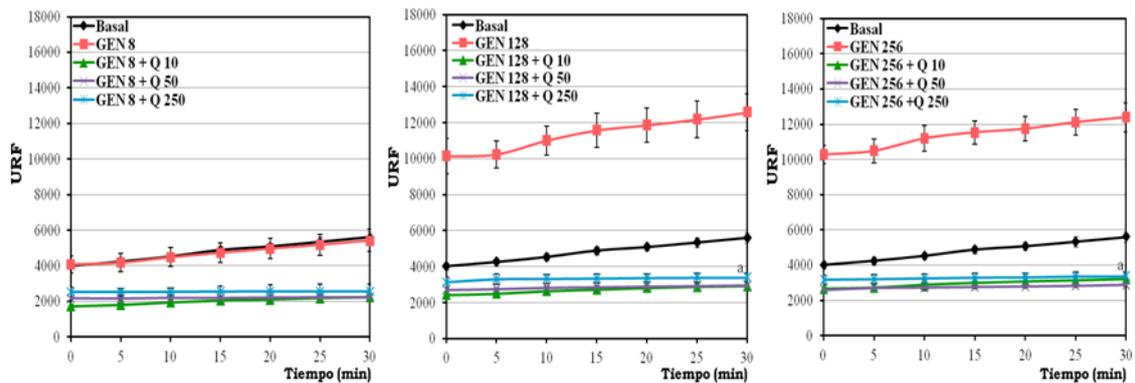


Figura 5.3: Curvas de producción de ERO de la combinación Q y GEN en leucocitos MN humanos. ^a $p < 0,001$ vs. GEN.

A 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN, Q fue capaz de disminuir las ERO alrededor de un 60 % por debajo del nivel de las células control a las tres concentraciones de estudio, lo cual podría deberse a la reconocida actividad scavenger de ERO de este flavonoide que provoca que, aún en ausencia de un incremento de ERO, el mismo sea capaz de disminuir estas especies reactivas por debajo del nivel basal (D'Andrea, 2015).

A su vez, 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$ de GEN, concentraciones en las cuales dicho antibiótico indujo un notable incremento de las ERO, Q logró una importante inhibición de estas especies reactivas alcanzando porcentajes de inhibición que varían entre el 133 % y el 138 % a las tres concentraciones del flavonoide evaluadas, manifestando nuevamente su importante actividad antioxidante. Cabe destacar que el efecto inhibitorio no manifiesta diferencias significativas entre las distintas concentraciones del flavonoide, siendo las tres igualmente potentes (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: Porcentajes de inhibición de Q sobre la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos MN humanos. $p > 0,05$ entre las distintas concentraciones de Q.

% Inhibición de producción de ERO			
Q (μM)	GEN ($\mu\text{g/mL}$)		
	8	128	256
10	---	138,5 \pm 2,3	135,1 \pm 3,9
50	---	138,2 \pm 1,1	138,3 \pm 1,5
250	---	134,1 \pm 3,4	132,9 \pm 3,4

Si analizamos el efecto los tres flavonoides aislados de *Flaveria bidentis* (Figura 5.4), podemos observar que el aglicón, es decir Q, cumple con los principales requerimientos estructurales determinantes tanto para la actividad captadora o scavenger de RL como para la actividad quelante de metales. Recordemos que estos requerimientos implican: la presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto (3',4') en el anillo B, la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo y la presencia en el anillo del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 junto con el grupo 4-ceto (Amić y col., 2007; Procházková y col., 2011; Shahidi y Ambigaipalan, 2015):

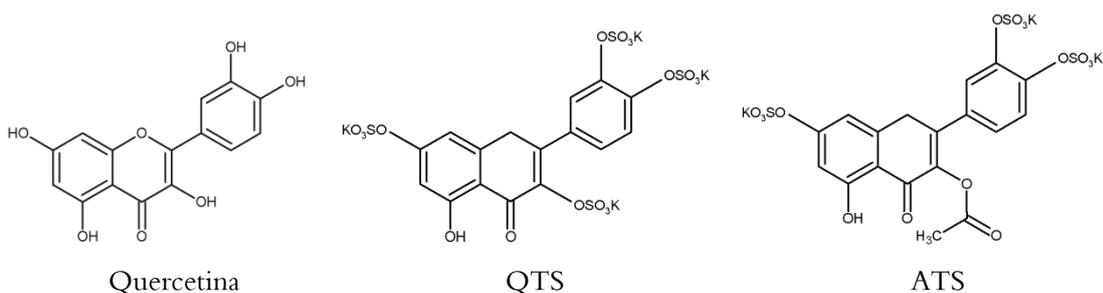


Figura 5.4: Estructura química de los flavonoides aislados de *F. bidentis*.

Por lo cual la presencia de dichos grupos funcionales en la estructura de Q puede justificar tan importante actividad inhibitoria de ERO, inducidas por GEN, que se observa para este flavonoide. A su vez, otro punto a destacar en relación a la actividad antioxidante, es la importancia del número y de la posición de los grupos OH en la molécula, ya que la sustitución de dichos grupos puede generar una disminución de dicha actividad, tal como se observa en el derivado tetrasulfatado (QTS), mientras que

para el derivado acetilado (ATS) se observa ausencia de actividad antioxidante y es más, un leve efecto prooxidante.

3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona – luteolina

Para el caso de L, flavonoide también aglicón pero del tipo flavona, se observa un importante efecto inhibitorio de la producción de ERO dependiente de la concentración, provocando una disminución de dichas especies por debajo del nivel basal, a todas las concentraciones de GEN evaluadas (Figura 5.5).

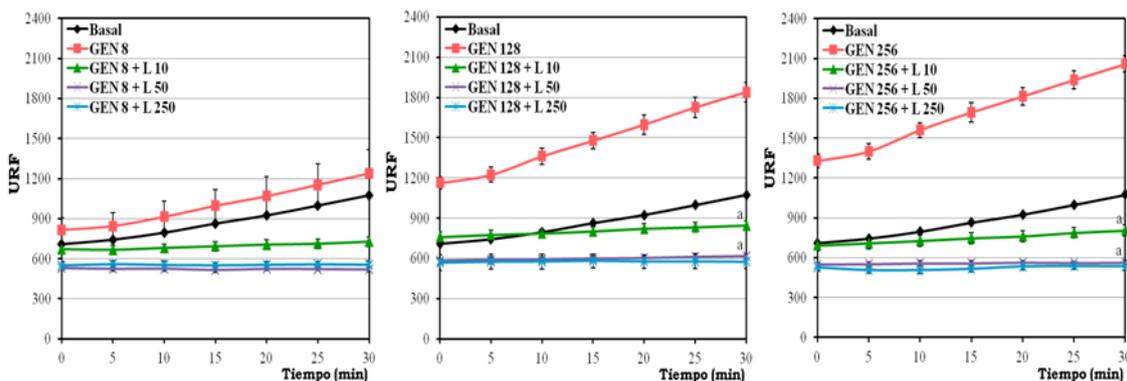


Figura 5.5: Efecto de L sobre la producción de ERO inducida por GEN a 8, 128 y 256 µg/mL en leucocitos MN humanos. ^ap<0,001 vs. GEN

Luteolina a la concentración de GEN en la cual el antibiótico no induce un aumento de ERO, 8 µg/mL, produjo una disminución del 32,2 % del nivel de especies reactivas por debajo del basal a una concentración de 10 µM, y del 50 % a las concentraciones de 50 y 250 µM del flavonoide. De igual modo que lo ocurrido con Q, este comportamiento podría deberse a la reconocida actividad scavenger de ERO de este flavonoide, que provoca una disminución de las ERO por debajo del nivel basal aún en ausencia de un incremento de las mismas (Zhao y col., 2012).

Por otra parte, a 128 y 256 µg/mL de GEN, concentraciones en las cuales se pudo realizar el cálculo de inhibición de ERO, se observó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración con valores cercanos al 128 % para L a 10 µM, mientras que para 50 y 250 µM de L los porcentajes de inhibición de ERO fueron similares entre si y cercanos a 163 % a 128 µg/mL de GEN y cercanos a 153 % a 256 µg/mL de GEN (Tabla 5.3).

Tabla 5.3: Porcentajes de inhibición de L sobre las ERO inducidas por GEN en leucocitos MN humanos. ^ap<0,001 vs. 50 µM; ^bp<0,001 vs. 250 µM

% Inhibición de producción de ERO			
L (µM)	GEN (µg/mL)		
	8	128	256
10	---	129,7 ± 4,7 ^{ab}	127,3 ± 4,1 ^{ab}
50	---	159,7 ± 3,0	151,8 ± 1,7
250	---	165,0 ± 6,7	154,7 ± 2,9

Luteolina, al igual que Q, manifestó un importante efecto inhibitorio de la producción de ERO inducidas por GEN, superando el 100 % de inhibición a todas las concentraciones evaluadas, lo cual se condice con el hecho de que al tratarse también de un flavonoide aglicón, no posee sustituidos los grupos hidroxilo de la molécula por lo que éstos se encuentran disponibles para donar un átomo de hidrogeno capaz de estabilizar la especie reactiva, y por lo tanto poseer mayor actividad antiradicalaria.

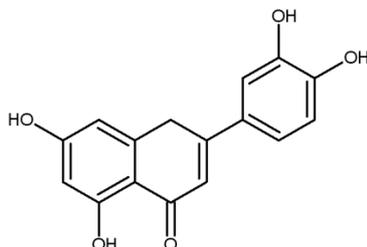


Figura 5.6: Estructura química de luteolina.

8-C-glucosilapigenina – vitexina

Vitexina, por su parte, a la concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ de GEN demostró un leve efecto inhibitorio de ERO sólo a las concentraciones de 50 y 250 μM del flavonoide, provocando una disminución del nivel de ERO de 15,6 % y 26,4 % respectivamente, con respecto al nivel basal. Por otra parte, a las concentraciones de GEN en las cuales el antibiótico indujo un aumento de estas especies reactivas, 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$, se observa un efecto inhibitorio dependiente de la concentración del flavonoide, alcanzando el nivel basal de las células control a 250 μM , máxima concentración evaluada del flavonoide (Figura 5.7).

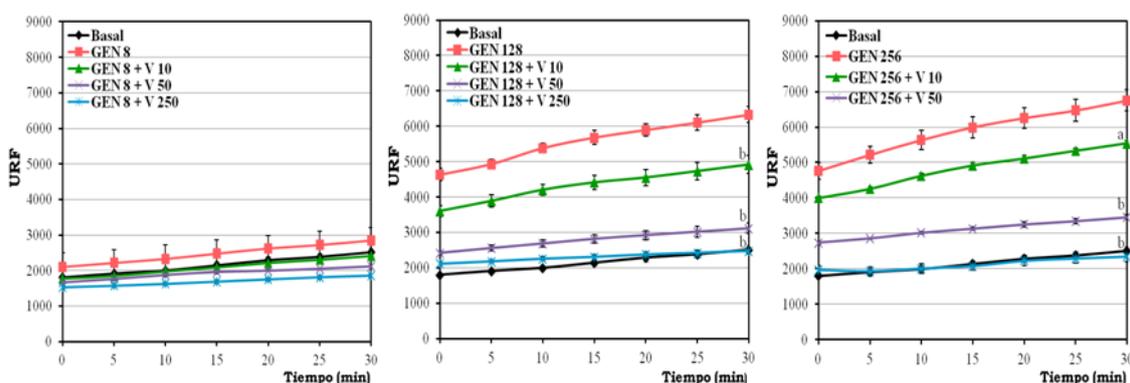


Figura 5.7: Producción de ERO en leucocitos MN humanos expuestos a la combinación de GEN y V. ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,001$ vs. GEN.

Los porcentajes de inhibición calculados a 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$ de GEN, confirman el efecto inhibitorio dependiente de la dosis de V, observándose que la máxima concentración del mismo logra alcanzar el 100 % de inhibición de la generación de ERO mediada por el antibiótico (Tabla 5.4).

Tabla 5.4: Porcentajes de inhibición de V sobre la producción de ERO mediada por GEN en leucocitos MN humanos. ^a $p < 0,001$ vs. $50 \mu\text{M}$; ^b $p < 0,05$; ^c $p < 0,001$ vs. $250 \mu\text{M}$

% Inhibición de producción de ERO			
V (μM)	GEN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	8	128	256
10	---	$34,3 \pm 8,4^{ac}$	$19,3 \pm 4,5^{ac}$
50	---	$83,6 \pm 4,1^b$	$77,3 \pm 1,8^c$
250	---	$101,1 \pm 1,9$	$104,2 \pm 3,9$

Por lo tanto, V manifestó un importante efecto inhibitorio de las ERO inducidas por GEN, que si bien no superó el 100 % de inhibición como los flavonoides aglicones L y Q, alcanzó dicho porcentaje a la máxima concentración evaluada.

6-C-glucosilapigenina – isovitexina

Isovitexina, isómero de posición del flavonoide V, produjo un aumento concentración-dependiente (31,9 %; 41,8 % y 52,4 %; respectivamente) en la producción de ERO por encima del nivel basal, a la concentración en la cual GEN no induce un aumento de las mismas ($8 \mu\text{g}/\text{mL}$). Mientras que a las concentraciones de 128 y $256 \mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN se observa un efecto contrario, ya que Iv provocó una inhibición de la producción de las ERO inducidas por el antibiótico de manera dependiente de la concentración, aunque sin alcanzar en ningún caso el nivel basal (Figura 5.8).

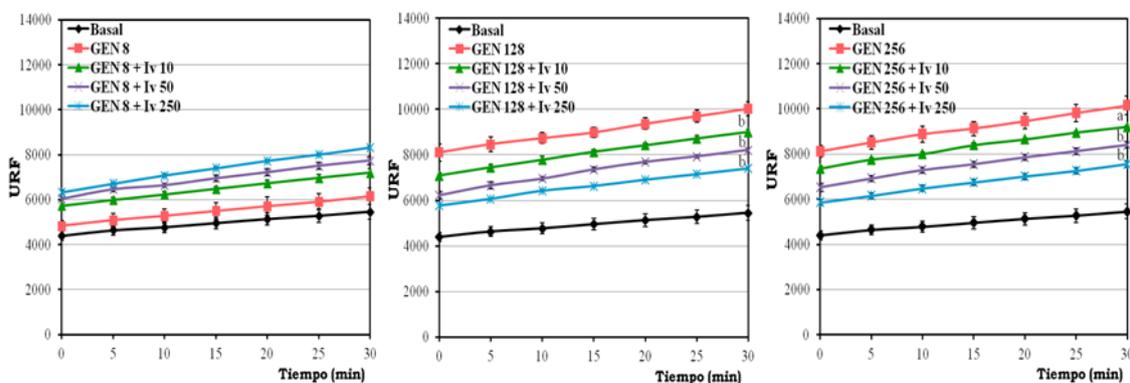


Figura 5.8: Curvas de producción de ERO de la combinación Iv y GEN en leucocitos MN humanos. ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,001$ vs. GEN.

Es decir que, en presencia de un agente inductor de ERO como lo es GEN, Iv ejerce un efecto inhibitorio de la producción de dichas especies, alcanzando porcentajes de inhibición del 60 % a la máxima concentración evaluada, siendo dichos valores 57,1 % a $128 \mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN y de 55,2 % a $256 \mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico (Tabla 5.5).

Tabla 5.5: Porcentajes de inhibición de Iv sobre las ERO inducidas por GEN en leucocitos MN humanos. ^ap<0,01; ^bp<0,001 vs. 50 μM; ^cp<0,05; ^dp<0,001 vs. 250 μM.

% Inhibición de producción de ERO			
Iv (μM)	GEN (μg/mL)		
	8	128	256
10	---	22,4 ± 5,9 ^{ad}	20,1 ± 2,6 ^{bd}
50	---	39,8 ± 5,1 ^c	37,0 ± 2,8 ^d
250	---	57,1 ± 1,4	55,2 ± 3,0

Vitexina e Iv, son flavonoides glicosilados ya que poseen una molécula de azúcar, en este caso glucosa, unida a su estructura (Figura 5.9). Es conocido que los flavonoides glicosilados muestran generalmente una disminución de la actividad antioxidante comparado con su correspondiente aglicón, pero la glicosilación también afecta parámetros como la solubilidad y estabilidad (Plaza y col., 2014). Dado que el efecto de la glicosilación no ha sido completamente aclarado principalmente en los flavonoides C-glicosilados, de los cuales la información en cuanto a su actividad antioxidante es bastante limitada, es necesaria la determinación del efecto de este tipo de flavonoides sobre la producción de ERO.

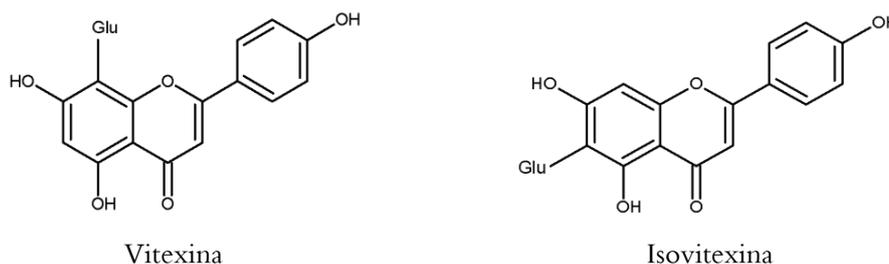


Figura 5.9: Estructura química de los flavonoides aislados de *P. nigra*.

Tal y como se observó en los resultados obtenidos, V, quien posee el azúcar unida a la posición C8, ejerció un efecto inhibitorio sobre la producción de ERO inducidas por GEN mayor a su isómero Iv, en el cual la glucosa se encuentra unida en la posición C6. Estos resultados corroborarían la teoría que indica que la glicosilación en C-8, que se observa en la estructura de V, disminuye la carga negativa sobre el átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo, lo cual podría mejorar el potencial antioxidante *in vitro* de dicho flavonoide con respecto a aquellos glicosilados en otras posiciones (Praveena y col., 2013).

Como se mencionó en el Capítulo 1, los flavonoides pueden poseer tanto actividad antioxidante como prooxidante lo cual depende de la estabilidad redox del radical formado a partir del flavonoide original, la concentración y estructura del flavonoide, y las condiciones fisiopatológicas del organismo (Procházková y col., 2011; Saeidnia y Abdollahi, 2013). Isovitexina demostró un efecto dual, ya que en el caso en el que no hubo aumento en la producción de ERO por parte del antibiótico, este

flavonoide manifestó un efecto prooxidante ya que provocó un aumento de estas especies por encima del nivel basal, sin embargo, esta situación se modificó completamente en los casos en los que GEN indujo un aumento importante de la producción de ERO, debido a que en esta situación Iv demostró un efecto antioxidante, ya que inhibió la producción de las mismas a todas las concentraciones evaluadas del flavonoide. El efecto prooxidante de los polifenoles ha sido observado por varios autores, y se ha postulado que los leves efectos prooxidantes de estos compuestos en situaciones normales, podrían generar en la célula una respuesta adaptativa activando vías antioxidantes que permitirían hacer frente a situaciones de estrés oxidativo más severas (como el generado por las concentraciones mayores de GEN), actuando de esta manera como un agente hormético, lo cual podría ser una de las causas por las que en situaciones de estrés más severo se observa un efecto mayoritario antioxidante. La hormesis se define como el efecto beneficioso de bajos niveles de estrés, es decir la respuesta adaptativa de una célula a un estrés moderado, para luego hacerle frente a situaciones de estrés más severas (Mattson, 2008). Mayores estudios serían necesarios para determinar si realmente la hormesis, puede estar influyendo en el efecto dual de isovitexina, sin embargo, a los fines de esta tesis, isovitexina no se presenta como uno de los flavonoides de mayor actividad protectora.

Los resultados obtenidos y las diferencias observadas en la actividad de los distintos flavonoides nos demuestran como el comportamiento de un antioxidante puede variar según el entorno en el que se encuentre y por lo tanto la importancia de evaluar cada situación en particular para poder determinar el efecto predominante en cada caso.

Comparación de las CI₅₀ de los flavonoides con el inhibidor de referencia (vitamina C)

Con el fin de poder comparar el efecto de todos los flavonoides en cuanto a la actividad inhibitoria de las ERO inducidas por GEN, en la segunda serie de experimentos se estimaron las CI₅₀ de cada uno de ellos a la concentración media de de GEN (128 µg/mL), dado que a la misma se genera una importante producción de ERO sin alteraciones en la viabilidad celular, y se compararon dichos valores con la CI₅₀ estimada para el inhibidor de referencia vitamina C.

Al comparar los valores de CI₅₀ de los distintos flavonoides que demostraron capacidad inhibitoria de las ERO inducidas por GEN, observamos que dos de ellos, **Q** y **L**, manifestaron un valor de CI₅₀ menor al inhibidor de referencia (vitamina C) mientras que para el resto de los flavonoides se obtuvieron valores por encima del mismo (Figura 5.10).

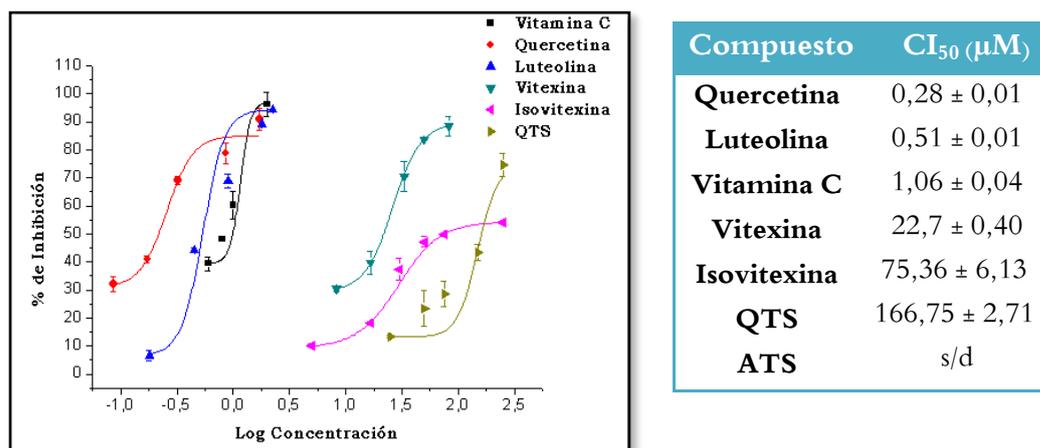


Figura 5.10: CI_{50} de los flavonoides frente a las ERO inducidas por GEN a 128 µg/mL en leucocitos MN humanos.

Si tenemos en cuenta las diferencias estructurales de los distintos flavonoides, observamos que los más activos son justamente los dos flavonoides aglicones, es decir, aquellos que poseen sus grupos OH no sustituidos y en las posiciones adecuadas en cuanto a los requerimientos estructurales que les permiten poseer actividad antioxidante, es más, la única diferencia estructural entre ellos es la presencia del OH en posición 3 el cual se encuentra en la estructura de **Q**, pero está ausente en la de **L**, lo cual es coincidente con la mayor actividad del primer flavonoide por sobre el segundo.

Los dos flavonoides C-glicosilados en el anillo A, **V** e **Iv**, poseen menor actividad inhibitoria que los flavonoides aglicones, lo cual es coincidente con el hecho de que se ha informado que la C-glicosilación en el anillo A disminuye la actividad antioxidante y que este efecto negativo puede resultar de las propiedades del azúcar en sí, más que del desplazamiento de un grupo hidroxilo libre (Xiao y col., 2016).

Por último se encuentran los flavonoides sulfatados derivados de quercetina, **QTS** y **ATS**, quienes poseen sustituidos la totalidad de los grupos OH de la estructura, lo cual altera significativamente la actividad antioxidante, tal y como observamos en los resultados obtenidos ya que son los que poseen menor actividad de todo el grupo de flavonoides evaluados.

Dada la mayor actividad de los flavonoides aglicones, **Q** y **L**, con respecto a la actividad del inhibidor de referencia, éstos fueron seleccionados para continuar con los estudios en cuanto al efecto de los mismos sobre la segunda población de leucocitos, es decir las células PMN, las cuales como se observó anteriormente poseen mayor capacidad de respuesta ante un estímulo de ERO, con respecto a las células MN.

5.4.2. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos polimorfonucleares humanos.

Se determinó el efecto de los flavonoides que demostraron mayor actividad en células MN, sobre la producción de ERO inducida por GEN en leucocitos PMN humanos.

3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona – quercetina

Quercetina, al igual que lo ocurrido en leucocitos MN, demostró una importante actividad inhibitoria de las ERO inducidas por GEN, a las tres concentraciones evaluadas de este antibiótico, en leucocitos PMN humanos.

A 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN, Q demostró un efecto inhibitorio de las ERO inducidas por dicho antibiótico, disminuyendo la producción de estas especies reactivas por debajo del nivel basal a las tres concentraciones de ensayo. Por otra parte, a 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN, sólo las concentraciones de 50 y 250 μM del flavonoide lograron disminuir la producción de ERO hasta alcanzar el nivel basal (Figura 5.11).

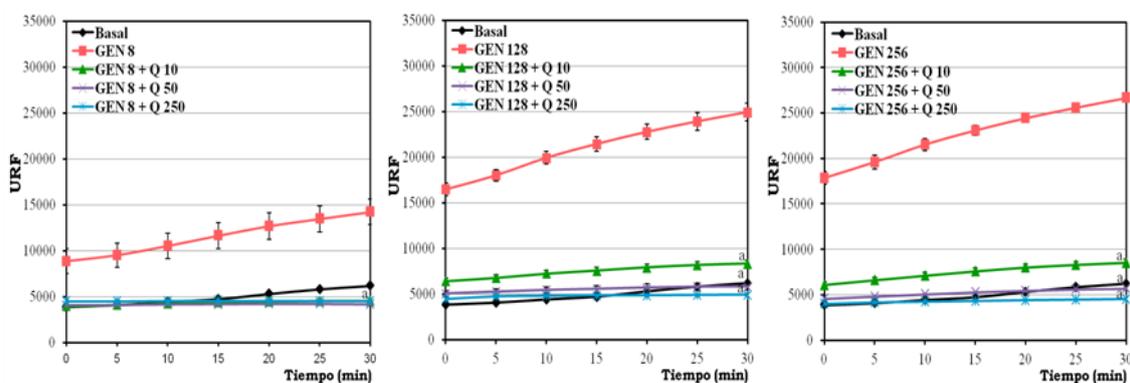


Figura 5.11: Efecto de Q sobre la producción de ERO mediada por GEN a 8, 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en leucocitos PMN humanos. ^a $p < 0,001$ vs. GEN.

En el caso de los leucocitos PMN se calcularon los porcentajes de inhibición de los flavonoides a 8, 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN, dado que el antibiótico, en éstas células, induce un aumento en la producción de ERO a las tres concentraciones evaluadas.

En cuanto a los porcentajes de inhibición calculados para Q, se observó que a la mínima concentración de GEN, el flavonoide supera el 100 % de inhibición con valores cercanos al 120 % a las tres concentraciones del mismo, en tanto que a las concentraciones de 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico, se observó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración de Q, en el cual las concentraciones de 50 y 250 μM alcanzaron y superaron levemente el 100 % de inhibición, mientras que a 10 μM de Q se observó una disminución del 88,6 % en la producción de ERO para ambas concentraciones de GEN (Tabla 5.6).

Tabla 5.6: Porcentaje de inhibición de Q sobre las ERO inducidas por GEN en leucocitos PMN humanos. ^a $p < 0,001$ vs. $50 \mu\text{M}$; ^b $p < 0,05$; ^c $p < 0,001$ vs. $250 \mu\text{M}$

% Inhibición de producción de ERO			
Q (μM)	GEN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	8	128	256
10	120,6 \pm 2,3	88,6 \pm 0,5 ^{ac}	88,6 \pm 0,4 ^{ac}
50	124,2 \pm 1,4	102,0 \pm 2,2 ^b	102,5 \pm 0,7 ^b
250	120,8 \pm 1,4	106,8 \pm 0,7	108,3 \pm 0,2

3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona – luteolina

Para el caso de L, este flavonoide también demostró un efecto inhibitorio de la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos PMN, sin embargo, el mismo fue menor al observado para Q. No hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones del flavonoide y en ningún caso L logró alcanzar el nivel basal de producción de ERO (Figura 5.12).

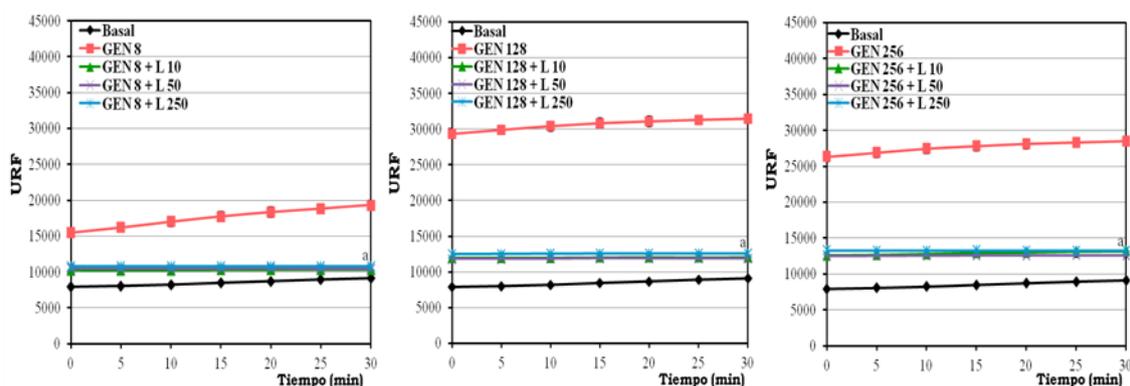


Figura 5.12: Producción de ERO en leucocitos MN humanos expuestos a la combinación de GEN y L. ^a $p < 0,001$ vs. GEN.

Los % de inhibición de L fueron cercanos al 90 % a una concentración de $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ de GEN, cercanos al 85 % para GEN a $128 \mu\text{g}/\text{mL}$ y cercanos al 80 % a $256 \mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico. Como se mencionó anteriormente todas las concentraciones del flavonoide demostraron similar actividad inhibitoria entre si (Tabla 5.7).

Tabla 5.7: Porcentajes de inhibición de L sobre las ERO inducidas por GEN a 8, 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en leucocitos PMN humanos. $p > 0,05$ entre las distintas concentraciones de L.

% Inhibición de producción de ERO			
L (μM)	GEN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	8	128	256
10	87,6 \pm 0,6	86,7 \pm 0,5	79,0 \pm 0,9
50	88,9 \pm 2,6	87,5 \pm 2,2	81,0 \pm 1,5
250	92,6 \pm 4,4	84,4 \pm 0,9	78,9 \pm 0,6

Los resultados obtenidos demostraron que ambos flavonoides manifestaron un importante efecto inhibitorio de la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos PMN humanos, las cuales tal y como se mencionó anteriormente, son células capaces de generar un nivel mayor de ERO en presencia de GEN con respecto a las células MN. El efecto inhibitorio fue mayor en Q que en L, de igual modo que se observó en los ensayos realizados sobre leucocitos MN, sin embargo, dados los porcentajes de inhibición cercanos al 100 % obtenidos a la mínima concentración evaluada de ambos flavonoides (10 μ M) y la necesidad de comparar su efecto frente a vitamina C, se procedió a estimar los valores de CI_{50} de los mismos.

Comparación de las CI_{50} de los flavonoides con el inhibidor de referencia (vitamina C)

Se estimó la CI_{50} de los flavonoides aglicones a la concentración de 128 μ g/mL de GEN, concentración a la cual GEN indujo un importante aumento en la producción de ERO sin alterar la viabilidad de las células PMN. Al comparar dichas CI_{50} con el valor estimado para vitamina C, se observó una importante actividad inhibitoria de la producción de ERO inducidas por GEN para ambos flavonoides (Figura 5.13).

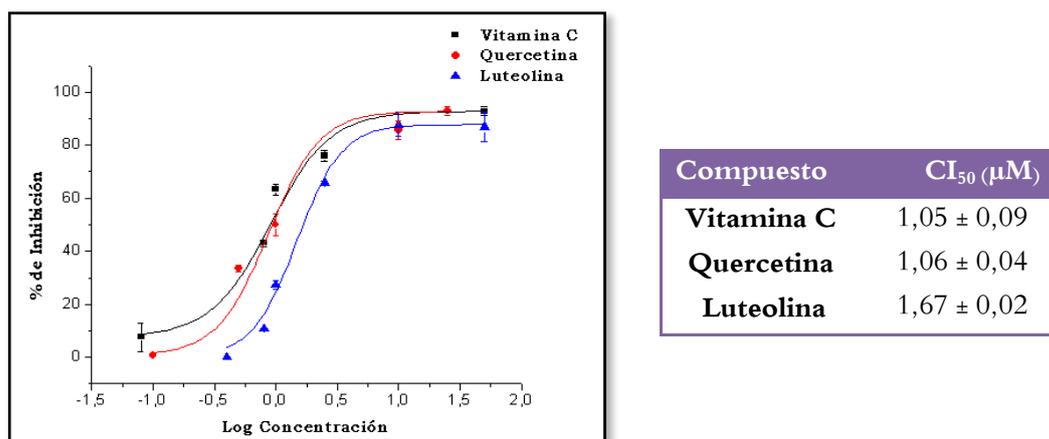


Figura 5.13: CI_{50} de los flavonoides frente a las ERO inducidas por GEN a 128 μ g/mL en leucocitos MN humanos.

Quercetina manifestó nuevamente mayor actividad que L, de igual modo a lo observado en leucocitos MN. Si comparamos los valores de CI_{50} con el inhibidor de referencia, se observa que Q posee una CI_{50} similar a vitamina C, mientras que el valor estimado para L fue ligeramente mayor, sin embargo, debido a que ambos flavonoides demostraron CI_{50} sumamente bajas, lo cual denota su buena actividad inhibitoria de la producción de ERO inducidas por GEN, se continuó con el estudio de los mismos sobre la actividad de enzimas antioxidantes endógenas y peroxidación lipídica, con el fin de comprender más claramente el efecto global por el cual estos flavonoides ejercen su acción protectora.

Como se observó anteriormente, ambos flavonoides, dado su potente efecto inhibitorio de ERO, provocaron una disminución en los niveles de estas especies reactivas por debajo del nivel basal, es decir por debajo de las concentraciones fisiológicas del organismo. Sin embargo, dado que las ERO juegan un importante rol en el mantenimiento del equilibrio homeostático, el cambio en el equilibrio redox hacia un estado reducido también puede provocar efectos nocivos para el organismo. Así, en los ensayos subsiguientes las concentraciones de Q y L fueron reajustadas según el valor de la CI_{50} de cada uno de ellos, con el fin de evitar la situación conocida como “Estrés Reductivo” (Touyz y col., 2016).

5.4.3. Efecto de flavonoides sobre la actividad Superóxido Dismutasa y Catalasa modificada por GEN en leucocitos humanos.

El efecto protector de los flavonoides frente al estrés oxidativo inducido por GEN, en un primer momento se lo podría atribuir al poder intrínseco de captación de ERO que poseen estos compuestos. Sin embargo, hay varios puntos a considerar, por un lado que los flavonoides además de su acción directa como scavenger de RL, poseen otros mecanismos antioxidantes, entre los que se encuentra su capacidad de activación de enzimas antioxidantes endógenas, y por el otro, se conoce que las enzimas antioxidantes endógenas, las cuales han sido diseñadas para eliminar las ERO, pueden reaccionar con estas especies reactivas a una velocidad mayor que la de los scavengers directos (Fernández-Pachón y col., 2009; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se propone evaluar el efecto de los flavonoides más activos (Q y L) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas SOD y CAT en leucocitos MN y PMN humanos, la cual tal como se observó en el Capítulo 4, es alterada en presencia de GEN. Para ello, se evaluaron concentraciones que permitan barrer todo el rango de inhibición de ERO según el valor de la CI_{50} estimadas para cada flavonoide en los ensayos de fluorescencia. Dichas concentraciones fueron en leucocitos MN, 0,06; 0,29 y 1,5 μ M para Q y 0,16; 0,5 y 1,6 μ M para L, mientras que en leucocitos PMN las mismas fueron para Q 0,1; 1 y 10 μ M y para L 0,4; 1,7 y 6,8 μ M.

En una primera serie de experimentos se evaluó el efecto directo de estos flavonoides sobre la actividad de las enzimas SOD y CAT en ausencia de GEN. Así, en leucocitos MN, se observó que ninguno de los dos flavonoides produce alteraciones en la actividad de las enzimas SOD y CAT por sí mismos, a ninguna de las concentraciones de ensayo (Figura 5.14).

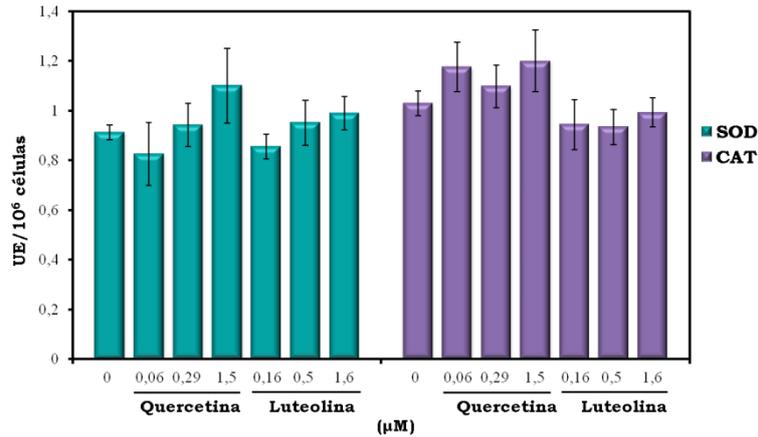


Figura 5.14: Efecto de Q y L sobre la actividad SOD y CAT en leucocitos MN. $p > 0.05$ vs. control (C) en todos los casos.

Por otra parte, en leucocitos PMN, se observa que ambos flavonoides inducen un aumento de la actividad de ambas enzimas a la mayor concentración evaluada, siendo mayor el efecto de Q en ambos casos. La actividad SOD aumentó $44,7 \pm 10,0$ % en presencia de Q y $21,2 \pm 9,2$ % en presencia de L, mientras que para CAT el aumento fue del $18,9 \pm 7,0$ % y $15,0 \pm 2,8$ %, respectivamente, para cada flavonoide (Figura 5.15).

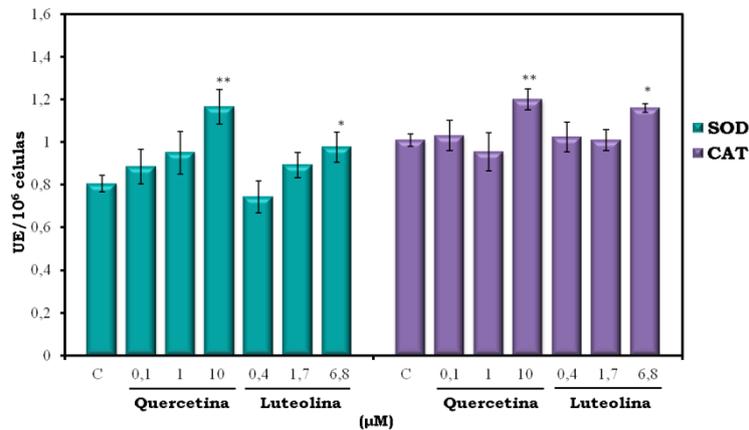


Figura 5.15: Efecto de Q y L sobre la actividad SOD y CAT en leucocitos PMN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. control (C).

De modo que, ambos flavonoides a la mayor concentración de ensayo, son capaces de aumentar la actividad SOD y CAT en leucocitos PMN humanos, por lo cual el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas podría ser otro de los mecanismos involucrados, a estas concentraciones y en este tipo de células, en la actividad antioxidante de los flavonoides Q y L.

Posteriormente se determinó el efecto de los mismos sobre la actividad SOD y CAT modificada por GEN en ambos tipos de leucocitos.

En leucocitos MN humanos, tanto en los casos en que GEN induce un aumento de la actividad enzimática, como cuando este antibiótico produce la disminución de la misma, ambos flavonoides a las tres concentraciones evaluadas tienden a restaurar la actividad antioxidante SOD y CAT de manera dependiente de la concentración, alcanzando valores similares a las células control, especialmente a la máxima concentración evaluada para cada uno de ellos (Figura 5.16).

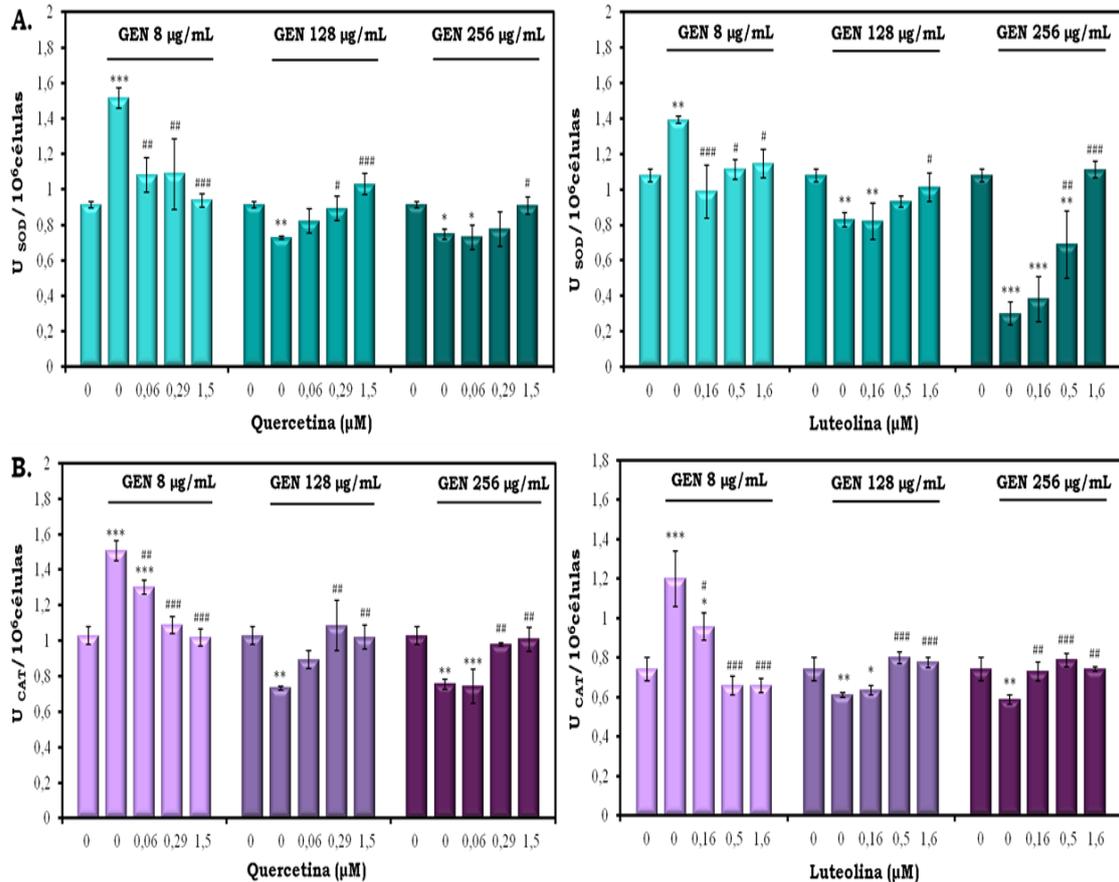


Figura 5.16: Actividad de las enzimas antioxidantes endógenas en leucocitos MN humanos expuestos a la combinación de GEN y los flavonoides Q y L. A. SOD, B. CAT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. GEN.

Con relación al efecto observado en leucocitos PMN humanos, en los cuales a todas las concentraciones de GEN la actividad SOD y CAT se ve disminuida, el comportamiento fue similar ya que nuevamente tanto Q como L tienden a restaurar la actividad de estas enzimas de manera dependiente de la concentración.

El grado de recuperación de la actividad enzimática varía según las distintas combinaciones de concentraciones evaluadas de GEN y los flavonoides, sin embargo al igual que en leucocitos MN, se observa que principalmente las mayores concentraciones de Q y L evaluadas logran alcanzar los niveles basales de actividad enzimática de las células control (Figura 5.17).

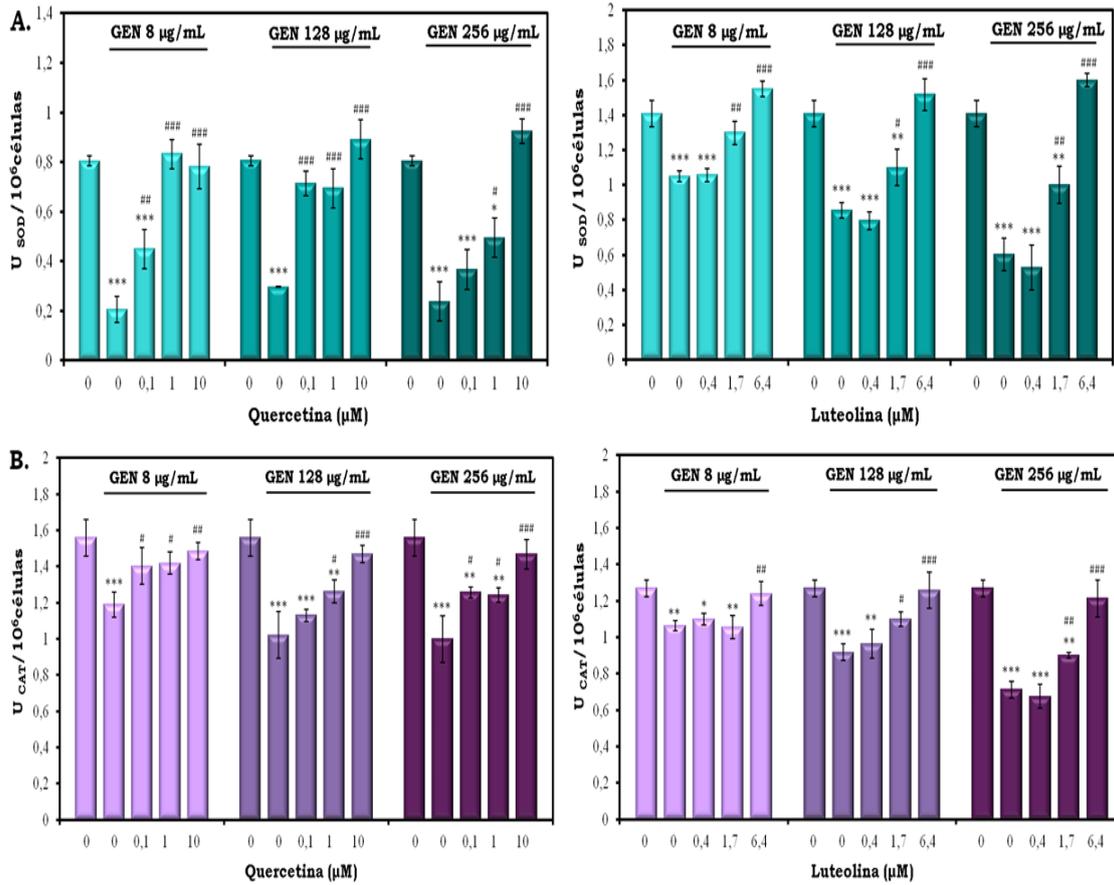


Figura 5.17: Actividad de las enzimas antioxidantes endógenas en leucocitos PMN humanos expuestos a la combinación de GEN y los flavonoides Q y L. A. SOD, B. CAT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. GEN.

Por consiguiente, el efecto scavenger de Q y L demostrado en los ensayos de inhibición de ERO, estaría cooperando con la actividad de las defensas antioxidantes endógenas SOD y CAT en ambos tipos de leucocitos humanos, permitiendo la recuperación de la actividad de estas enzimas, la cual es modificada en presencia de GEN, logrando alcanzar los niveles basales de las células control.

Sin embargo, dado que en células PMN ambos flavonoides a la máxima concentración de ensayo son capaces de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas *per se*, en este tipo de leucocito además de la actividad scavenger directa demostrada en los ensayos de fluorescencia, también podría estar participando la capacidad intrínseca de activación de enzimas antioxidantes endógenas.

5.4.4. Efecto de flavonoides sobre la peroxidación lipídica inducida por GEN en leucocitos humanos.

Para evaluar el efecto de los flavonoides más activos sobre un biomarcador de estrés oxidativo, se determinó la peroxidación lipídica, lo cual nos permitiría observar el efecto global en cuanto al equilibrio oxidativo-antioxidante de la célula.

Ambos tipos de leucocitos (MN y PMN), tratados simultáneamente con GEN y los flavonoides, manifestaron una significativa reducción de los niveles de MDA comparado con las células tratadas solo con GEN.

Particularmente, Q logró alcanzar valores de MDA similares al nivel basal a todas las concentraciones probadas en ambos tipos de células, es decir que dicho flavonoide logró inhibir un 100 % el incremento de la peroxidación lipídica inducida por GEN, en todas las combinaciones (Figura 5.18).

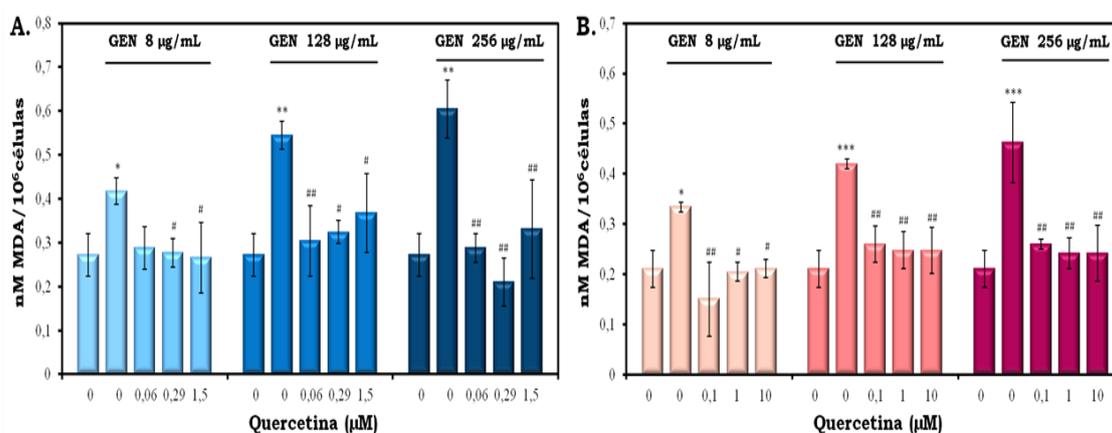


Figura 5.18: Efecto de Q sobre la peroxidación lipídica inducida por GEN en: A. leucocitos MN, B. leucocitos PMN. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. GEN.

Por otra parte, para el caso de L se observó, al igual que lo ocurrido con Q, una importante disminución de los niveles de MDA incrementados por GEN, efecto que manifestó ser dependiente de la concentración del flavonoide, tanto en MN como en PMN. Las concentraciones media y máxima evaluadas de L (1,7 y 6,4 µM) lograron inhibir un 100 % el aumento de peroxidación lipídica en ambos tipos de células a las tres concentraciones evaluadas de GEN, mientras que la concentración de 0,4 µM del flavonoide produjo una disminución en los niveles de MDA cuyos porcentajes de disminución varían entre el 31 y el 58 %, dependiendo del tipo de célula y la combinación de concentraciones. Los valores de los mismos fueron $33,1 \pm 11,1$ % para GEN a 8 µg/mL; $31,0 \pm 9,9$ % para GEN a 128 µg/mL y $58,4 \pm 16,6$ % para GEN a 256 µg/mL, en células MN, en tanto que en leucocitos PMN dichos % fueron $48,5 \pm 12,3$ %; $57,1 \pm 9,2$ % y $36,4 \pm 10,7$ %; respectivamente para 8, 128 y 256 µg/mL de GEN (Figura 5.19).

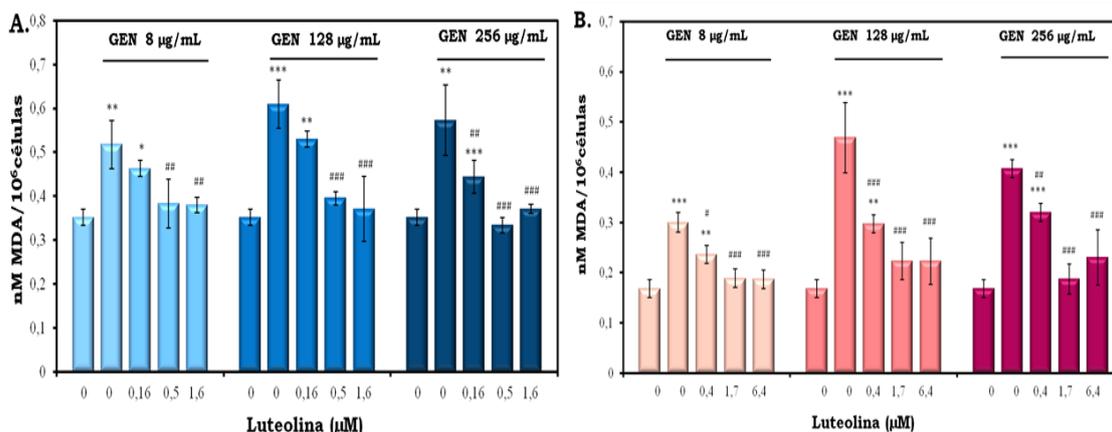


Figura 5.19: Efecto de L sobre la peroxidación lipídica en presencia de 8, 128 y 256 µg/mL de GEN en: A. leucocitos MN, B. leucocitos PMN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. GEN.

De este modo se puede observar que ambos flavonoides aglicones son capaces de disminuir la peroxidación lipídica generada por GEN tras 4 horas de incubación en ambos tipos de leucocitos humanos, siendo el efecto de L dependiente de la concentración, mientras que quercetina alcanza los niveles basales de MDA a todas las concentraciones evaluadas.

5.5. Conclusiones Parciales

La variabilidad en los resultados obtenidos, en cuanto a su actividad inhibitoria de la producción de ERO inducidas por GEN de los 6 flavonoides aislados, dejó en manifiesto la importancia de la determinación de cada situación en particular dado que los diferentes entornos alteran el efecto predominante antioxidante–prooxidante de cada flavonoide. En este sentido toman importancia las diferencias observadas en los derivados sulfatados de quercetina los cuales, teniendo solo un grupo funcional diferente en su estructura, presentaron efectos totalmente contrarios. Así mismo, resulta de gran interés la demostrada actividad antioxidante de los flavonoides isómeros C–glicosilados de los cuales se contaba con escasa información al respecto, con lo cual estos resultados son un gran aporte al conocimiento en este sentido.

Quercetina y L demostraron una potente actividad inhibitoria de las ERO inducidas por GEN en ambos tipos de leucocitos, sin embargo es necesario trabajar cuidadosamente con las concentraciones de los mismos con el fin de evitar desplazar el equilibrio redox hacia un estado reducido también perjudicial para el organismo.

Tanto Q como L, tienden a restaurar la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas modificada por GEN, alcanzando los niveles basales. Este efecto estaría dado por el poder reductor y/o de captación directa de ERO manifestado en los ensayos de producción de ERO intracelular, y en el caso de las concentraciones mayores también

participaría la capacidad intrínseca de ambos flavonoides de aumentar la actividad de dichas enzimas antioxidantes, de este modo los flavonoides lograrían cooperar con las defensas antioxidantes endógenas permitiendo la recuperación de la actividad de estas enzimas en presencia del antibiótico.

Quercetina y L, además demostraron ser capaces de evitar la peroxidación lipídica producida por GEN en ambos tipos de leucocitos humanos.

De este modo, Q y L demostrarían un marcado efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por GEN en leucocitos humanos *in vitro*, disminuyendo el estrés oxidativo y cooperando en el restablecimiento del balance oxidante-antioxidante de las células.

5.6. Bibliografía

- Amić, D., Davidović-Amić, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucić, B., Trinajstić, N., 2007. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr. Med. Chem.* 14 (7), 827-845.
- Balakumar, P., Rohilla, A., Thangathirupathi, A., 2010. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol. Res.* 62 (3), 179-186.
- Bilgin, G., Kismet, K., Kuru, S., Kaya, F., Senes, M., Bayrakceken, Y., Yumusak, N., Celikkan, F.T., Erdemli, E., Celemlı, O.G., Sorkun, K., Koca, G., 2016. Ultrastructural investigation of the protective effects of propolis on bleomycin induced pulmonary fibrosis. *Biotech. Histochem.* 91 (3), 195-203.
- D'Andrea, G., 2015. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia.* 106, 256-271.
- Eugenio-Pérez, D., Montes de Oca-Solano, H.A., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Role of food-derived antioxidant agents against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharm. Biol.* 54 (10), 2340-2352.
- Fernández-Pachón, M.S., Berná, G., Otaolauruchi, E., Troncoso, A.M., Martín, F., García-Parilla, M.C., 2009. Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake. *J. Agric. Food Chem.* 57 (15), 6578-6583.
- Fu, C., Jiang, Y., Guo, J., Su, Z., 2016. Natural Products with Anti-obesity Effects and Different Mechanisms of Action. *J. Agric. Food Chem.* 64 (51), 9571-9585.
- Maldonado, P.D., Barrera, D., Rivero, I., Mata, R., Medina-Campos, O.N., Hernández-Pando, R., Pedraza-Chaverri, J., 2003. Antioxidant s-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic. Biol. Med.* 35 (3), 317-324.
- Mattson, M.P., 2008. Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.* 7 (1), 1-7.
- Moreira, M.A., Nascimento, M.A., Bozzo, T.A., Cintra, A., Sônia, M., Dalboni, M.A., Mouro, M.G., Higa, E.M.S., 2014. Ascorbic acid reduces gentamicin-induced

- nephrotoxicity in rats through the control of reactive oxygen species. *Clin. Nutr.* 33 (2), 296–301.
- Noorani, A.A., Gupta, K.A., Bhadada, K., Kale, M.K., 2011. Protective effect of methanolic leaf extract of *Caesalpinia bonduc* (L.) on gentamicin induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Iranian. J. Pharmacol. Ther.* 10 (1), 21–25.
- Parlakpınar, H., Tasdemir, S., Polat, A., Bay-karabulut, A., Vardi, N., Ucar, M., Acet A., 2005. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicolpgy.* 207 (2), 169–177.
- Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K.Z., Turner, C., Karlsson, E.N., 2014. Substituent effects on in vitro antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 62 (15), 3321–3333.
- Praveena, R., Sadasivam, K., Kumaresan, R., Deepha, V., Sivakumar, R., 2013. Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 103, 442–452.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Flavonoids antioxidants and prooxidants. *Fitoterapia.* 82 (4), 513–523.
- Saeidnia, S., Abdollahi, M., 2013. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271 (15), 49–63.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. *J. Funct. Foods.* 18, 820–897.
- Touyz, R.M., Anagnostopoulou, A., De Lucca Camargo, L., Montezano, A.C., 2016. Novel biosensors reveal a shift in the redox paradigm from oxidative to reductive stress in heart disease. *Circ. Res.* 119 (9): 969–971.
- Vacca, R.A., Valenti, D., Caccamese, S., Daglia, M., Braidy, N., Nabavi, S.M., 2016. Plant polyphenols as natural drugs for the management of Down syndrome and related disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 71, 865–877.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A.R., Miron, A., 2016. Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, S29–45.
- Yang, T.H., Young, Y.H., Liu, S.H., 2011. EGb 761 (*Ginkgo biloba*) protects cochlear hair cells against ototoxicity induced by gentamicin via reducing reactive oxygen species and nitric oxide-related apoptosis. *J. Nutr. Biochem.* 22 (9), 886–894.
- Zhao, G., Yao-Yue, C., Qin, G.W., Guo, L.H., 2012. Luteolin from Purple Perilla mitigates ROS insult particularly in primary neurons. *Neurobiol. Aging.* 33 (1), 176–86.
- Zhao, X., Zhang, J., Tong, N., Chen, Y., Luo, Y., 2012. Protective effects of berberine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 35 (5), 796–800.



Capítulo 6:
Efecto de flavonoides frente al estrés oxidativo
inducido por Gentamicina in vivo



6.1. Introducción

Algunos aspectos importantes a tener en cuenta al evaluar la eficacia de una terapia con antioxidantes es la capacidad del mismo de alcanzar concentraciones intracelulares suficientemente altas *in vivo* como para lograr reproducir un efecto observado *in vitro*. Es por ello que, si bien estudiar los potenciales efectos antioxidantes *in vitro* debe ser el primer objetivo a realizar, dadas las discrepancias que se observan a la hora de correlacionar los efectos *in vitro* e *in vivo* de los flavonoides, resulta primordial y necesaria la realización de ensayos en modelos animales que nos permitan confirmar y validar el efecto observado *in vitro* (Boots y col., 2008; Martins y col., 2016).

Al realizar ensayos *in vivo* en los cuales se evalúe la producción de ERO generadas por algún agente oxidante, es importante analizar el tipo de estrés oxidativo que se está desarrollando en el sistema. Esto se debe a que el aumento en el nivel de estado estacionario de ERO puede afectar a muchos sistemas del organismo y las consecuencias de este aumento difieren y dependen del nivel y lugar de la generación de las ERO, la eficiencia de los sistemas antioxidantes, la disponibilidad de recursos energéticos y los objetivos celulares con los que estas especies interactúan. Una forma útil para poder determinar esto es observar la variación en la producción de ERO en función de tiempo. En condiciones normales, el nivel de ERO fluctúa en cierto rango definido por el funcionamiento equilibrado de los sistemas generadores y eliminadores de especies reactivas, sin embargo frente a ciertas situaciones, como la introducción de ciertos oxidantes, el nivel de ERO puede aumentar drásticamente y abandonar el nivel de estado estacionario. En este caso si los sistemas antioxidantes son capaces de hacer frente adecuadamente al incremento de estas especies, este nivel volvería al estado inicial, evento que puede ser denominado **Estrés Oxidativo Agudo**, donde no solo debe observarse un aumento en el nivel de ERO sino que dicho aumento debe tener algunas consecuencias fisiológicas más o menos específicas, tales como la activación de las defensas antioxidantes endógenas. En otros casos, la célula no es capaz de neutralizar por sí sola las cantidades de ERO aumentadas y devolver el nivel de ERO al valor inicial. Incluso una mayor expresión de antioxidantes y enzimas relacionadas no sería capaz de hacer frente a eso. En consecuencia, el nivel de ERO puede ser disminuido pero sin lograr alcanzar el estado estacionario inicial, o en su defecto extendiendo demasiado el tiempo necesario para que dicho estado sea alcanzado. Debido a que en esta situación ocurre la modificación de diferentes componentes celulares, ya que es posible observar los efectos dañinos sobre distintas biomoléculas, lo que perturba sustancialmente la homeostasis, este estado puede ser llamado **Estrés Oxidativo Crónico**. Por último, un escenario más que puede tener lugar después de un estallido de oxidativo, es aquel en el que el nivel de ERO no puede volver al nivel inicial y el sistema se estabiliza en un nuevo estado denominado **Nivel Cuasi-estacionario**, el cual necesita una reorganización sustancial de la homeostasis completa (Figura 6.1) (Lushchak, 2014).

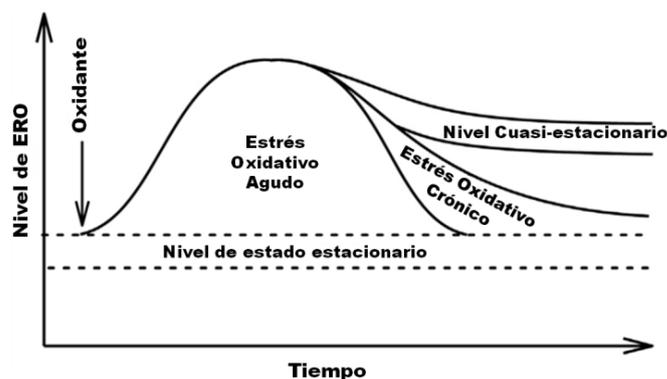


Figura 6.1: *Dinámica del nivel de ERO bajo condiciones control y estresantes en sistemas biológicos (adaptado de Lushchak., 2014).*

En conclusión, después del estallido oxidativo, los organismos pueden ser sometidos a estrés oxidativo agudo o crónico, o alcanzar un nuevo estado cuasi-estacionario. En muchos casos, el desarrollo de estos eventos depende de la posibilidad de que los organismos vivos ajusten sus sistemas de defensa a niveles de ERO mejorados, por lo cual, cuando se evalúan distintos estados patológicos asociadas al estrés oxidativo estas situaciones deben ser evaluadas, para comprender la dinámica de los procesos involucrados en el estado redox total del sistema.

Si bien en los capítulos anteriores se trabajó en leucocitos humanos, otro sistema interesante para evaluar es la sangre entera. La activación de las células PMN y en particular de los neutrófilos es considerada una de las principales fuentes de estrés oxidativo en seres humanos, sin embargo, tanto los leucocitos como los eritrocitos son células capaces de acelerar la generación de ERO en presencia de agentes oxidantes. En consecuencia, el estrés oxidativo puede ser evaluado en leucocitos aislados o directamente en la sangre entera (Correa Salde y Albesa, 2009). De hecho, se ha demostrado que el estrés oxidativo valorado en sangre periférica refleja el estado redox a nivel sistémico, y que la correlación que presentan algunos parámetros indicativos de este estrés, como sucede con MDA, SOD y CAT, entre sus valores en sangre y en tejidos es muy elevada, lo cual sugiere que la mayoría de los biomarcadores redox medidos en sangre reflejan adecuadamente el estado redox del tejido (Margaritelis y col., 2015).

En las últimas décadas se han evaluado numerosas intervenciones farmacológicas, alguna de ellas muy prometedoras, con el fin de prevenir la toxicidad, principalmente nefrotoxicidad, ototoxicidad y hepatotoxicidad, inducida por GEN en distintos modelos animales la cual se relaciona con un aumento de estrés oxidativo (Balakumar y col., 2010). En virtud de ello, numerosos productos naturales se han evaluado como potenciales agentes protectores contra los efectos tóxicos de GEN (Ademiluyi y col., 2013; Adil y col., 2016; Balakumar y col., 2010; Moreira y col., 2014; Noorani y col., 2011; Parlakpınar y col., 2005; Tavafi y col., 2012; Yang y col., 2011).

Particularmente, existe un antecedente en cuanto al efecto protector de vitamina C sobre el estrés oxidativo inducido por GEN en sangre entera de rata, sin embargo dicho estudio fue realizado utilizando dosis 140 % por encima del límite máximo de prescripción, mientras que no se han evaluado hasta el momento las consecuencias de este antibiótico sobre el status redox a nivel periférico tras ser administrado a dosis terapéuticas (Correa Salde, 2011).

Centrándonos en el grupo de los flavonoides, se han realizado varios estudios evaluando el efecto protector de los mismos contra la nefrotoxicidad y la ototoxicidad inducida por este antibiótico *in vivo*, demostrando una importante reducción de estos efectos tóxicos (Anandan y Subramanian, 2012; Draz y col., 2015; Fouad y col., 2014; Kandemir y col., 2015; Promsan y col., 2016; Sardana y col., 2015). Sin embargo, si bien dentro de los estudios realizados con flavonoides existen dos reportes en cuanto al efecto protector de Q frente a la nefrotoxicidad y ototoxicidad inducida por GEN *in vivo* (Abdel-Raheem y col., 2009; Sagit y col., 2015), nuevamente estos estudios utilizaron altas concentraciones de GEN (no dosis terapéuticas), con el análisis de ERO realizado principalmente en los tejidos u órganos específicos, que son afectados según el tipo de efecto secundario en el que se encuentra centrado cada estudio, mientras que nunca se ha evaluado el efecto de dosis terapéuticas de este antibiótico sobre la circulación sistémica.

Por lo tanto, se propuso evaluar el efecto oxidante de dosis terapéuticas de GEN a nivel de circulación sistémica en un modelo *in vivo* en ratas y determinar la acción de los flavonoides Q y L *in vivo* sobre los efectos tóxicos de dicho antibiótico.

6.2. Objetivo

- ✚ Determinar *in vivo*, en un modelo murino, el efecto de Q y L sobre el estrés oxidativo inducido por GEN, evaluando la producción de ERO, la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas y la peroxidación lipídica con el fin de determinar si es posible extrapolar el efecto observado en células sanguíneas aisladas a la circulación sistémica.

6.3. Metodología

6.3.1. Animales

Ratas Wistar macho adultas (70 días de edad, con un peso aproximado de 300 g) se mantuvieron a 22 °C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con libre acceso a alimentos y agua. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio según lo aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (# 564/2015).

6.3.2 Diseño Experimental

Al momento de iniciar los experimentos, los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 6 ratas cada uno, para conformar los siguientes grupos experimentales:

Grupo I: Control (C): Las ratas recibieron solución salina i.p con vehículo (DMSO al 0,95 %) en una fosa ilíaca y solución salina en la fosa ilíaca opuesta.

Grupo II: Control de Flavonoide (Q ó L): Las ratas se trataron con el flavonoide a una dosis de 7,5 mg/(kg día) de peso corporal disuelto en DMSO al 0,95 % y solución salina, cada tratamiento administrado en una fosa ilíaca distinta.

Grupo III: Control de gentamicina (GEN): Las ratas recibieron una inyección i.p de sulfato de GEN a concentraciones crecientes durante el tratamiento que oscilan entre 3 y 6 mg/kg/día en una fosa ilíaca y una inyección de solución salina con vehículo en la fosa ilíaca opuesta.

Grupo IV: GEN + Flavonoide (GEN+Q ó L): Las ratas se trataron con sulfato de GEN (3–6 mg/kg/día) y el flavonoide (7,5 mg/kg/día) disuelto en DMSO al 0,95 %, cada tratamiento administrado en una fosa ilíaca distinta.

Todos los tratamiento se administraron por vía intraperitoneal en dos dosis diarias durante 5 días consecutivos.

La dosis de GEN utilizada se corresponde con la dosis terapéutica recomendada en humanos, mientras que la dosis administrada para los flavonoides fue seleccionada según bibliografía de estudios previos, realizados con estos compuestos y esta vía de administración, en los cuales se utilizan concentraciones que varían entre 5 y 20 mg/kg/día (González–Esquivel y col., 2015; Nabavi y col., 2012).

6.3.3 Preparación de las muestras y parámetros a evaluar

La sangre de una pequeña incisión en la cola de cada rata se extrajo antes del comienzo del tratamiento (día 0) y 4 h después de la primera dosis en los días 1 y 3 del tratamiento. Además, al quinto día, los animales fueron sacrificados y se obtuvo sangre troncal. El ensayo de fluorescencia se utilizó para determinar los niveles de ERO en sangre entera el primer, tercer y quinto día de tratamiento, mientras que los ensayos colorimétricos se usaron para las determinaciones de SOD y CAT (en sangre entera) y MDA (en plasma) solo el quinto día de tratamiento, siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 4.

Los resultados se expresaron (según corresponda) como Unidades Relativas de Fluorescencia en función del tiempo, Unidades SOD ó CAT/mg de proteína o nM de MDA/mg de proteína.

La cuantificación de proteínas presentes en las muestras de sangre y plasma se realizó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Para ello las muestras de sangre entera se diluyeron en buffer HBSS en un factor de 1/1000, mientras que el plasma se diluyó en un factor 1/100 en el mismo buffer. Luego, a 5 µL de sangre o

plasma, previamente diluido, se le adicionaron 250 μL de reactivo de Bradford y la absorbancia del complejo formado se midió a 595 nm en Lector de Absorbancia en Microplacas, luego de incubar la placa durante 15 min a temperatura ambiente. Los valores de las concentraciones de proteínas en las muestras problema se obtuvieron a partir de una curva de calibración utilizando albúmina como testigo en un rango entre 0,125–1 mg/mL.

6.3.4. Análisis Estadístico

Todos los valores se expresan como la media \pm D.S. Los resultados se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples utilizando GraphPad InsStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). $p < 0,05$ fue seleccionado como criterio de diferencia significativa.

6.4. Resultados y Discusión

Se presentan los resultados en cuanto al efecto de Q y L sobre el estrés oxidativo inducido por GEN *in vivo*.

3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona – quercetina

En sangre entera de ratas tratadas con GEN a dosis terapéuticas (3–6 mg/kg/día), el nivel de ERO aumentó significativamente un $80,6 \pm 19,4 \%$, en comparación con el grupo control, manifestando un pico máximo de producción de ERO el primer día de tratamiento. Luego, la curva de producción de ERO decae a lo largo del tiempo, sin embargo, culminado el tratamiento, en ningún momento se recuperó el nivel inicial de producción de especies reactivas (Figura 6.2).

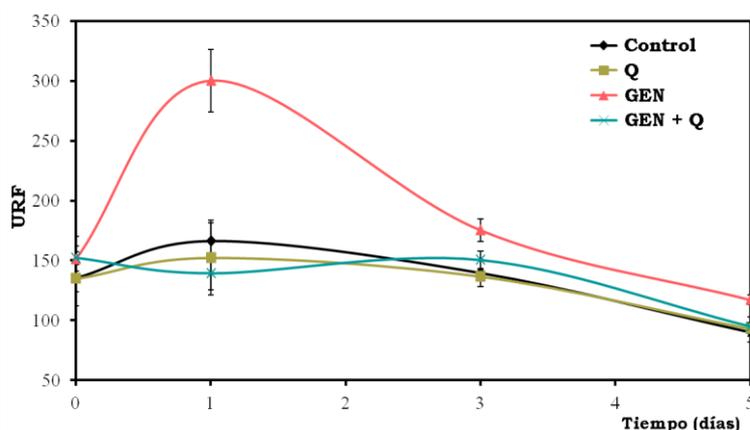


Figura 6.2: Efecto de Q sobre la producción de ERO inducida por GEN a nivel sistémico *in vivo*.

Interesantemente, el grupo al cual se le administró el tratamiento conjunto de GEN+Q evidenció una reducción sustancial de los niveles de ERO en comparación con los animales inyectados sólo con GEN, manteniendo valores similares al grupo control. Cabe destacar que no hubo diferencias significativas en los niveles de ERO entre los grupos control, Q y GEN+Q.

En cuanto a las actividades de SOD y CAT en sangre entera, y los niveles de MDA en plasma, se observó que en el grupo de ratas que sólo recibió el tratamiento con GEN, los valores de los mismos se incrementaron significativamente ($94,6 \pm 9,3 \%$, $49,9 \pm 7,9 \%$ y $41,1 \pm 6,0 \%$ respectivamente), en comparación con el grupo control (Figura 6.3).

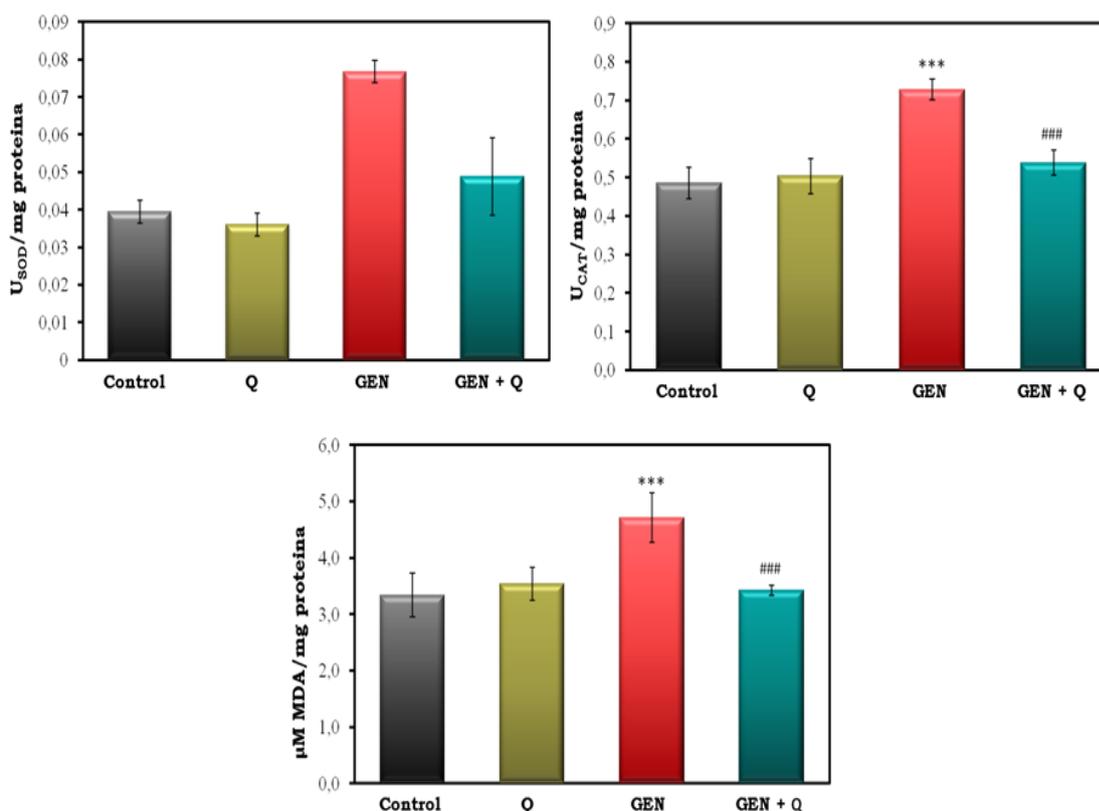


Figura 6.3: Efecto de Q sobre la actividad SOD, CAT y peroxidación lipídica inducida por GEN a nivel sistémico in vivo. *** $p < 0,001$ vs. control; ### $p < 0,001$ vs. GEN.

Por otra parte, la administración simultánea de GEN+Q (7,5 mg/kg/día) provocó una importante disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) y en los niveles de MDA respecto a las ratas tratadas solo con GEN, manteniendo valores similares a los de las ratas de control. Nuevamente, no hubo diferencias significativas en las actividades de SOD y CAT y el nivel de MDA entre los grupos control, Q y GEN+Q.

3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona – luteolina

Para el caso de los ensayos realizados con L se observó, en general, un comportamiento muy similar al observado con Q.

El grupo de ratas que solo recibió el tratamiento con GEN evidenció un aumento del $74,2 \pm 10,6$ % en la producción de ERO respecto del grupo control, con un pico máximo observado el primer día de tratamiento y, de igual modo a lo manifestado en los ensayos con Q, si bien se observa una disminución en la producción de estas especies, en ningún momento del tiempo que dura el tratamiento, se logró recuperar el nivel de ERO inicial (Figura 6.4).

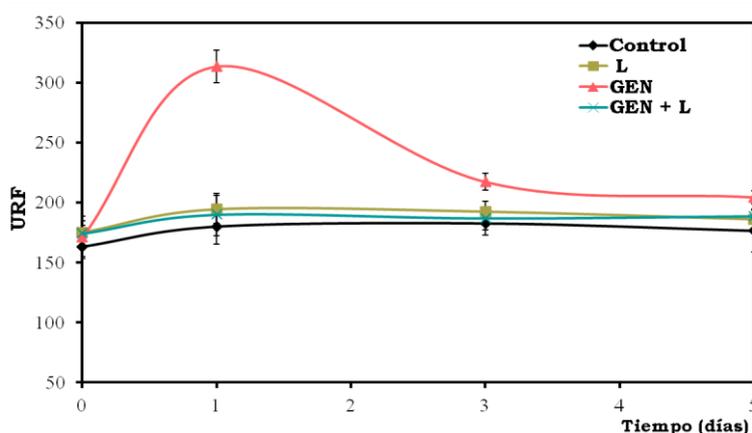


Figura 6.4: Curvas de producción de ERO en sangre entera de ratas tratadas con GEN y L.

A su vez, el grupo de ratas que recibió el tratamiento simultáneo de GEN+L, manifestó una significativa disminución en los niveles de ERO en comparación con el grupo que recibió sólo GEN, logrando mantener los niveles de producción de ERO a valores similares a los de las ratas control. No hubo diferencias significativas en los niveles de ERO entre los grupos control, L y GEN+L.

Por otro lado en cuanto a la actividad SOD y CAT, se observó un aumento del $103,6 \pm 20,4$ % en la actividad SOD y del $68,6 \pm 6,5$ % en la actividad CAT en aquellas ratas que recibieron sólo la administración del antibiótico, de igual modo que se manifiesta una elevación en los niveles de MDA del $31,5 \pm 5,6$ % con respecto al grupo control. Sin embargo, la administración conjunta de GEN+L logró mantener la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas a valores similares a los niveles basales observados en las ratas control, aún en presencia del antibiótico. En cuanto a la peroxidación de lípidos, se observa una importante disminución en los niveles de MDA respecto del grupo que sólo recibió la administración de GEN, sin embargo, en este caso no se logran alcanzar los niveles observados para las ratas control dado que existen diferencias significativas entre este grupo y el que recibió la administración conjunta de GEN+L. No hubo diferencias significativas en las actividades de SOD y CAT entre los grupos control, L y GEN+L. (Figura 6.5).

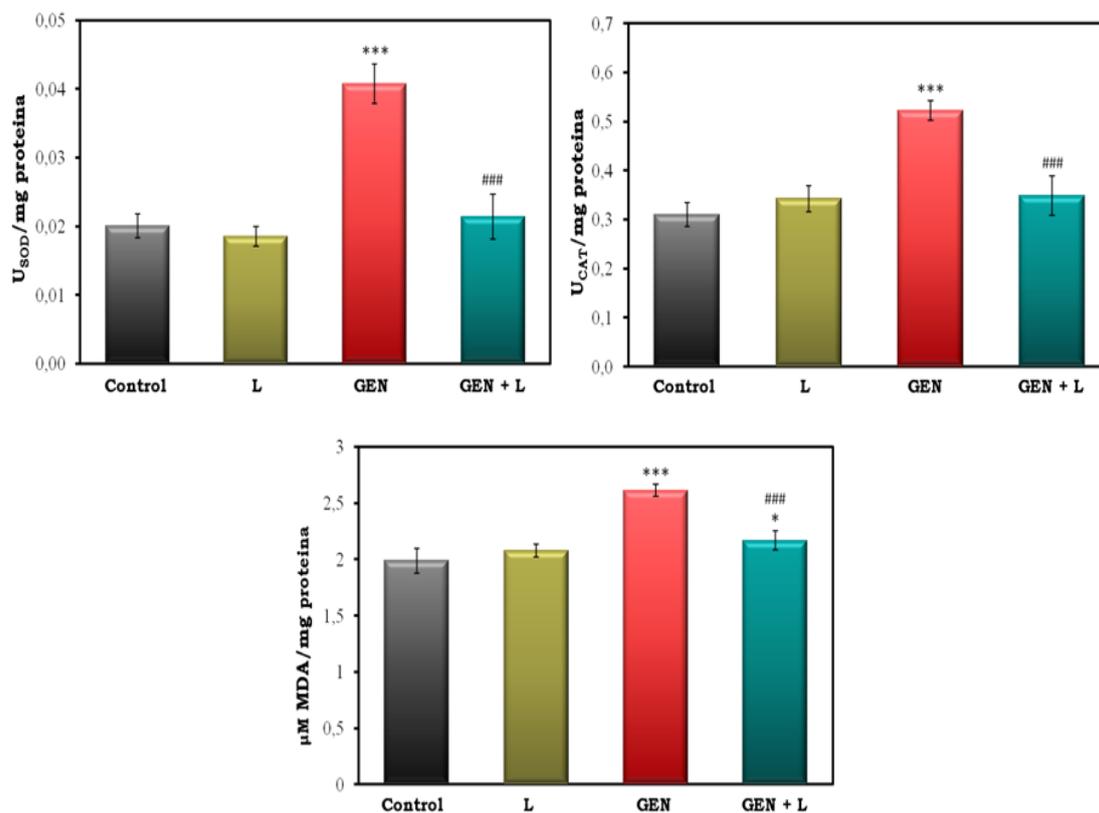


Figura 6.5: Actividad SOD, CAT y peroxidación lipídica en ratas tratadas con GEN y L.
 * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. control; ### $p < 0,001$ vs. GEN.

Acorde a los resultados obtenidos *in vivo* y en relación a las curvas de producción de ERO, podríamos indicar que la administración de GEN estaría induciendo un tipo de estrés conocido como **Estrés Oxidativo Crónico** a nivel de la circulación sistémica. Este hecho se ve manifestado tras la administración del antibiótico, que si bien genera un aumento en los niveles de ERO y un decaimiento posterior en el tiempo, en ningún momento se logra la recuperación del estado estacionario inicial (Figura 6.1). A su vez, si se analiza el último día de tratamiento, en el cual tras sacrificar a los animales se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas y el nivel de peroxidación lipídica, se puede vislumbrar que la actividad de las enzimas antioxidantes se ve aumentada en respuesta al incremento en la producción de ERO, pero su capacidad de contrarrestar estas ERO generadas evidentemente se ve sobrepasada, ya que continúa observándose cierto nivel de producción de ERO por encima del nivel observado en las ratas control, hecho indicativo que no se logró alcanzar el estado estacionario inicial. Esto se demuestra además, al observar un incremento que varía entre 30 y 40 % en la peroxidación lipídica, indicando el daño que estas ERO, que no están siendo neutralizadas por dichas enzimas, comienzan a generar en las biomoléculas.

Los resultados obtenidos están respaldados por diversos estudios realizados en cuanto a la toxicidad de GEN *in vivo* que sugieren la implicancia del estrés oxidativo en los principales efectos secundarios de GEN (nefrotoxicidad, ototoxicidad y hepatotoxicidad) y los efectos protectores de varios antioxidantes frente a la toxicidad inducida por este antibiótico *in vivo* (Abdelsameea y col., 2016, Ademiluyi y col., 2013; Maldonado y col., 2003, Parlakpinar y col., 2005, Yang y col., 2011). Sin embargo, en los estudios citados, se observa una actividad reducida de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT), hecho contrario al comportamiento observado en la presente tesis doctoral. Posiblemente estas discrepancias pueden deberse a las diferencias en las concentraciones de GEN utilizadas, ya que en los experimentos aquí planteados se trabajó con concentraciones terapéuticas del antibiótico (3–6 mg/kg/día) capaces de inducir un aumento de la actividad enzimática endógena como una respuesta para contrarrestar las ERO generadas por GEN, mientras que en los estudios previos, los autores utilizaron concentraciones del antibiótico mucho más altas que las empleadas en tratamientos terapéuticos, abarcando un rango entre 80 a 140 mg/kg/día, una condición que dada la toxicidad manifestada por GEN, podría producir la disminución en la actividad de estas enzimas antioxidantes endógenas, evidenciada en estos estudios.

Centrándonos en el efecto de los flavonoides, se manifiesta que tanto Q como L son capaces de actuar como agentes protectores frente al estrés oxidativo inducido por GEN a nivel sistémico. Ambos flavonoides son capaces de, disminuir la producción de ERO demostrando una importante capacidad captadora de ERO *in vivo*, evitar la activación del sistema antioxidante enzimático endógeno y disminuir los efectos nocivos de oxidación de lípidos.

El hecho de poder confirmar *in vivo* el efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por GEN observado en células sanguíneas *in vitro*, es de gran relevancia, ya que un punto importante a considerar en cuanto al efecto de los flavonoides es la biodisponibilidad de los mismos cuando son administrados en un modelo *in vivo*. Los estudios *in vitro*, si bien brindan información sumamente valiosa a la hora de determinar un efecto en particular, no consideran el metabolismo, las barreras biológicas y las reacciones químicas del organismo humano. Por otro lado, algunos compuestos, tras ser administrados en su forma activa carecen del potencial bioactivo luego de ser metabolizados, mientras que otros sólo adquieren su forma bioactiva tras su metabolización o pueden convertirse en metabolitos aún más activos que la molécula inicial (Martins y col., 2016). Los cambios metabólicos que pueden sufrir los flavonoides incluyen una extensa desglucosilación de fase I en el caso de los flavonoides glicosilados y metabolismo de fase II incluyendo glucuronidación, sulfatación y O-metilación de los aglicones resultantes. La microflora colónica también participa en el metabolismo de flavonoides ya que las enzimas bacterianas pueden catalizar una amplia variedad de reacciones incluyendo hidrólisis de glucurónidos, sulfatos y glicósidos, deshidroxilación, desmetilación, reducción de dobles enlaces, escisión del anillo y

descarboxilación de algunos ácidos fenólicos. Sin embargo, si bien los flavonoides pueden ser ampliamente metabolizados, se han encontrado ciertos niveles de flavonoides libres en el plasma, y a su vez diversos estudios han demostrado que los metabolitos de flavonoides como (-)-epicatequina y Q retienen cierta capacidad antioxidante, contribuyendo con la capacidad antioxidante en plasma de rata (Procházková y col., 2011). Cabe destacar que en el caso de L diferentes reportes sugieren que la biodisponibilidad de este flavonoide es suficientemente alta y su metabolismo suficientemente bajo, como para permitir que este flavonoide ejerza algunas de sus actividades biológicas en un entorno *in vivo* (López-Lázaro, 2009).

Otro punto a considerar es que diversos estudios han demostrado que la administración repetida de flavonoides es capaz de aumentar su biodisponibilidad comparada con la administración de una dosis única (Guo y col., 2014; Paulke y col., 2008; Rangel-Ordóñez y col., 2010). Particularmente se ha demostrado que las vidas medias de los metabolitos de Q son bastante altas, de 11 a 28 h, lo cual indica que, con la administración repetida de Q, se podrían alcanzar un nivel plasmático considerable logrando rangos de concentraciones de nano y hasta micromolar (D'Andrea, 2015).

De todas maneras, independientemente del metabolismo que puedan sufrir los flavonoides Q y L en el sistema evaluado, ambos han demostrado un importante efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por GEN a nivel sistémico *in vivo*, lo cual nos permitiría validar los resultados observados en los ensayos con células sanguíneas humanas *in vitro*.

6.5. Conclusiones Parciales

Los resultados *in vivo* demostraron que GEN es capaz de inducir la generación de **Estrés Oxidativo Crónico** a nivel sistémico, situación manifestada por un aumento en la producción de ERO capaz de sobrepasar las defensas antioxidantes endógenas, provocando que el nivel de especies reactivas se mantenga por encima del estado estacionario inicial con la consecuente inducción de daño oxidativo en las biomoléculas.

La administración simultánea de GEN con los flavonoides Q y L permitió disminuir el estrés oxidativo generado por este antibiótico a nivel sistémico. En este sistema, ambos flavonoides demostraron una importante capacidad captadora de ERO, disminuyendo la producción de las especies reactivas inducidas por GEN a niveles basales, lo cual contribuye con la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas permitiendo reducir la peroxidación lipídica. De esta forma se demostró un marcado efecto protector de Q y L frente al estrés oxidativo inducido por GEN a dosis terapéuticas *in vivo*. Si bien en los ensayos no se llevaron a cabo estudios de biodisponibilidad de dichos flavonoides, se pudo confirmar el efecto manifestado por estos en los ensayos *in vitro*.

Por lo tanto, la administración simultánea de los flavonoides Q ó L con GEN podría representar una opción terapéutica potencial ya que demuestra un marcado efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por este antibiótico en la circulación sistémica.

6.6. Bibliografía

- Abdel-Raheem, I.T., Abdel-Ghany, A.A., Mohamed G.A., 2009. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 61-67.
- Abdelsameea, A.A, Mohamed, A.M., Amer, M.G., Attia, S.M., 2016. Cilostazol attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 68 (4), 247-253.
- Ademiluyi, A.O., Oboh, G., Owoloye, T.R., Agbebi, O.J., 2013. Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (6), 470-475.
- Adil, M., Kandhare, A.D., Dalvi, G., Ghosh, P., Venkata, S., Raygude, K.S., Bodhankar, S.L., 2016. Ameliorative effect of berberine against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats via attenuation of oxidative stress, inflammation, apoptosis and mitochondrial dysfunction. *Ren. Fail.* 38 (6), 996-1006.
- Anandan, R., Subramanian, P., 2012. Renal protective effect of hesperidin on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in male Wistar albino rats. *Redox Rep.* 17 (5), 219-226.
- Balakumar, P., Rohilla, A., Thangathirupathi, A., 2010. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol. Res.* 62 (3), 179-186.
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585 (2-3), 325-337.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Correa Salde, V., Albasa, I., 2009. Reactive oxidant species and oxidation of protein and hemoglobin as biomarkers of susceptibility to stress caused by chloramphenicol. *Biomed. Pharmacother.* 63 (2), 100-104.
- D'Andrea, G., 2015. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia.* 106, 256-271.
- Draz, E.I., Abdin, A.A., Sarhan, N.I., Gabr, T.A., 2015. Neurotrophic and antioxidant effects of silymarin comparable to 4-methylcatechol in protection against gentamicin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Pharmacol. Rep.* 67 (2), 317-325.
- Fouad, A.A., Albuali, W.H., Zahran, A., Gomaa, W., 2014. Protective effect of naringenin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38(2), 420-429.

- González-Esquivel, A.E., Charles-Niño, C.L., Pacheco-Moisés, F.P., Ortiz, G.G., Jaramillo-Juárez, F., Rincón-Sánchez, A.R., 2015. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress in liver and kidney induced by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in rats. *Toxicol. Mech. Methods.* 25 (3), 166-175.
- Guo, Y., Mah, E., Bruno, R.S., 2014. Quercetin bioavailability is associated with inadequate plasma vitamin C status and greater plasma endotoxin in adults. *Nutrition.* 30 (11-12), 1279-1286.
- Kandemir, F.M., Ozkaraca, M., Yildirim, B.A., Hanedan, B., Kirbas, A., Kilic, K., Aktas, E., Benzer, F., 2015. Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats. *Ren. Fail.* 37 (3), 518-525.
- López-Lázaro, M., 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev. Med. Chem.* 9(1), 31-59.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164-175.
- Maldonado, P.D., Barrera, D., Rivero, I., Mata, R., Medina-Campos, O.N., Hernández-Pando, R., Pedraza-Chaverrí, J., 2003. Antioxidant s-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic. Biol. Med.* 35 (3), 317-324.
- Margaritelis, N.V., Veskoukis, A.S., Paschalis, V., Vrabas, I.S., Dipla, K., Zafeiridis, A., Kyparos, A., Nikolaidis, M.G., 2015. Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers.* 20 (2), 97-108.
- Martins, N., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2016. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends Food Sci. Technol.* 48, 1-12.
- Moreira, M.A., Nascimento, M.A., Bozzo, T.A., Cintra, A., Sônia, M., Dalboni, M.A., Mouro, M.G., Higa, E.M.S., 2014. Ascorbic acid reduces gentamicin-induced nephrotoxicity in rats through the control of reactive oxygen species. *Clin. Nutr.* 33 (2), 296-301.
- Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Eslami, S., Moghaddam, A.H., 2012. *In vivo* protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. *Food Chem.* 132, 931-935.
- Noorani, A.A., Gupta, K.A., Bhadada, K., Kale, M.K., 2011. Protective effect of methanolic leaf extract of *Caesalpinia bonduc* (L.) on gentamicin induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Iranian. J. Pharmacol. Ther.* 10 (1), 21-25.
- Parlakpınar, H., Tasdemir, S., Polat, A., Bay-karabulut, A., Vardi, N., Ucar, M., Acet A., 2005. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicolpgy.* 207 (2), 169-177.
- Paulke, A., Nöldner, M., Schubert-Zsilavec, M., Wurglics, M., 2008. St. John's wort flavonoids and their metabolites show antidepressant activity and accumulate in brain after multiple oral doses. *Pharmazie.* 63 (4), 296-302.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Flavonoids antioxidantes y prooxidantes. *Fitoterapia.* 82 (4), 513-523.

- Promsan, S., Jaikumkao, K., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N., Chatsudthipong, V., Arjinajarn, P., Pompimon, W., Lungkaphin, A., 2016. Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94 (8), 808–818.
- Rangel-Ordóñez, L., Nöldner, M., Schubert-Zsilavec, M., Wurglics, M., 2010. Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba extract EGb 761®. *Planta Med.* 76 (15), 1683–1690.
- Sagit, M., Korkmaz, F., Gürgen, S.G., Gundogdu, R., Akcadag, A., Ozcan, I., 2015. Quercetin attenuates the gentamicin-induced ototoxicity in a rat model. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 79 (12), 2109–2114.
- Sardana, A., Kalra, S., Khanna, D., Balakumar, P., 2015. Nephroprotective effect of catechin on gentamicin-induced experimental nephrotoxicity. *Clin. Exp. Nephrol.* 19 (2), 178–184.
- Tavafí, M., Ahmadvand, H., Toolabi, P., 2012. Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran. J. Kidney Dis.* 6 (1), 25–32.
- Yang, T.H., Young, Y.H., Liu, S.H., 2011. EGb 761 (Ginkgo biloba) protects cochlear hair cells against ototoxicity induced by gentamicin via reducing reactive oxygen species and nitric oxide-related apoptosis. *J. Nutr. Biochem.* 22 (9), 886–894.



*Capítulo 7:
Actividad antibacteriana de Gentamicina en
combinación con flavonoides*



7.1. Introducción

Los fármacos antibacterianos son sustancias químicas capaces de matar o inhibir el desarrollo bacteriano, y para lograr ello, poseen distintos mecanismos de acción mediante los cuales pueden atacar a dichos microorganismos. Particularmente los aminoglucósidos, entre los cuales se encuentra GEN como uno de los principales representantes de este grupo, son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, y si bien son altamente eficaces frente a muchos microorganismos Gram-negativos, también son activos frente a algunas bacterias Gram-positivas (Rang y col., 2000).

Las interacciones entre los diferentes fármacos y sus dianas bacterianas están bien estudiadas y predominan tres clases de mecanismos por los cuales los antibióticos ejercen su efecto, ellos son: inhibición de la replicación y reparación del ADN, inhibición de la síntesis de proteínas, y alteración de la pared celular. Sin embargo, numerosos trabajos han revelado que la muerte celular mediada por antibióticos es un proceso complejo y multifacético que no puede ser plenamente explicado por las interacciones directas de los antibióticos con sus objetivos celulares específicos. En los últimos años, además, se ha revelado que independientemente del mecanismo de acción principal por el que actúan los distintos grupos de fármacos antibacterianos, el estrés oxidativo estaría implicado como otro de los mecanismos por los que distintos grupos de antibióticos matan a las bacterias, demostrándose que son capaces de inducir cambios en el metabolismo bacteriano que promueven la formación de ERO, las cuales juegan un papel destacado en la muerte celular (Albesa y col., 2004; Kohanski y col., 2007; Belenky y col., 2015; Liu y col., 2016). Particularmente se ha reportado que las principales clases de antibióticos bactericidas, entre los que se encuentran los aminoglucósidos, perturban el metabolismo y la respiración conduciendo al aumento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y a la liberación de hierro ferroso que, por reacciones de tipo Fenton, conduce a la formación de concentraciones letales de HO^{\cdot} , lo cual contribuye a la eficiencia de estos fármacos. A su vez, numerosos estudios realizados específicamente con aminoglucósidos, entre ellos GEN, han demostrado que las células bacterianas tratadas con estos antibióticos, presentaban cambios citotóxicos indicativos de estrés oxidativo, incluyendo altos valores de producción de RL, mayores niveles de carbonilación de proteínas, aductos de MDA, oxidación de nucleótidos y rupturas de ADN de doble cadena (Belenky y col., 2015; Dwyer y col., 2015; Kohanski y col., 2007, 2008; Páez y col., 2010a; Wang y Zhao, 2009).

Otro punto importante a destacar es que además, se ha reportado que justamente la capacidad de las distintas cepas bacterianas de generar mecanismos capaces de hacer frente al estrés oxidativo generado por los antibióticos, es uno de los factores que contribuye a la resistencia microbiana, la cual se presenta como uno de los problemas actuales más importantes en cuanto a la terapia contra las infecciones (Dwyer y col., 2009; Kohanski y col., 2010; Páez y col., 2010b).

Los flavonoides, son compuestos naturales a los cuales se les atribuyen un amplio número de actividades biológicas, entre las que se encuentra, además de su capacidad antioxidante, una importante actividad antibacteriana. Los extractos crudos de plantas con un historial de uso en medicina popular, así como también los distintos flavonoides aislados de las mismas, se han examinado en cuanto a la actividad antibacteriana por muchos grupos de investigación. Los estudios de los mecanismos por los cuales los flavonoides pueden ejercer esta actividad han sugerido tres mecanismos principales: daño y/o reducción de la fluidez de la membrana plasmática, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos e inhibición del metabolismo energético en la bacteria (Cushnie y Lamb, 2011). Particularmente, se han llevado a cabo estudios con los flavonoides Q y L los cuales han demostrado poseer actividad antibacteriana en algunas cepas Gram-positivas y Gram-negativas (Betts y col., 2015; Liu y col., 2010; López-Lázaro, 2009).

Debido a que entre los mecanismos de acción de distintos antibióticos estaría involucrada la generación de estrés oxidativo en bacterias, y ante la posibilidad de utilizar flavonoides antioxidantes como protectores frente al estrés oxidativo inducido por los antibióticos en células humanas, es necesario determinar el efecto de estos flavonoides sobre la actividad antibacteriana de GEN, a los fines de conocer si esta estrategia farmacológica no afecta a la efectividad del fármaco.

Al evaluar el efecto sobre la actividad biológica al combinar dos fármacos o compuestos químicos, se pueden presentar tres tipos de interacción: sinergismo, aditivismo y antagonismo. El **sinergismo** es la interacción que ocurre cuando la combinación de dos diferentes compuestos genera un efecto mayor a la suma de los efectos individuales de los mismos, en el caso del **aditivismo**, dicha combinación provoca un efecto de igual magnitud que la suma de sus efectos individuales, y por último el **antagonismo**, ocurre en el caso en que la combinación de los compuestos genera una disminución de los efectos individuales de los mismos (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

Para poder evaluar la actividad antibacteriana de un compuesto, el parámetro más utilizado es la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la cual se define como la menor concentración de droga capaz de inhibir cualquier crecimiento bacteriano visible (Chung y col., 2011).

Otro parámetro útil para analizar los efectos sobre la actividad biológica cuando se combinan dos antibacterianos, es la determinación de la Concentración Inhibitoria Fraccional (CIF) de cada compuesto, la cual se calcula como el cociente entre la CIM del compuesto en combinación y la CIM del compuesto solo. La sumatoria de las CIF de los dos compuestos en estudio se conoce como el Índice CIF (ICIF), el cual según el valor que posea nos da información del tipo de interacción que estaría ocurriendo. Por lo tanto, la ecuación para calcular el Índice CIF se podría resumir de la siguiente manera:

$$\text{ICIF}_{\text{FL+ATB}} = \frac{\text{CIM}_{\text{FL}} \text{ en la combinación}}{\text{CIM}_{\text{FL}} \text{ solo}} + \frac{\text{CIM}_{\text{ATB}} \text{ en la combinación}}{\text{CIM}_{\text{ATB}} \text{ solo}}$$

Siendo CIM_{FL} : la CIM del flavonoide, CIM_{ATB} : la CIM del antibiótico e $\text{ICIF}_{\text{FL+ATB}}$: el Índice CIF de la combinación flavonoide+antibiótico.

Cuando el ICIF de la combinación es igual o inferior a 0,5 la combinación se define como **sinérgica**, cuando el mismo se encuentra entre 0,5 y 1 se define como un efecto **aditivo** y entre 1,0 y 4,0 se clasifica como **indiferente**. Finalmente, un ICIF mayor a 4,0 indica **antagonismo** entre los componentes de la combinación (EUCAST, 2000; Johnson y col., 2004; Páez y col., 2013).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva que crece en la nariz y piel humana, y un importante patógeno para las infecciones respiratorias, de piel y tejidos blandos. Además, es un importante agente nosocomial responsable de varias infecciones adquiridas en el hospital, incluyendo bacteriemia, infecciones cutáneas y shock séptico. Las infecciones adquiridas en el hospital constituyen un grave problema sanitario, en particular debido al aumento de la prevalencia de *S. aureus* resistente a múltiples antibióticos. Este patógeno está asociado con diversas enfermedades infecciosas y tiene una tasa de mortalidad de 36–50 % (Joung y col, 2016). Por otra parte, *Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa y principal anaerobio facultativo que habita en el intestino grueso de humanos y animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* viven inofensivamente en el colon y rara vez causan enfermedad en individuos sanos, un número importante de cepas patógenas pueden causar enfermedades intestinales y extraintestinales tanto en individuos sanos como inmunocomprometidos, causadas en muchos casos por consumo de agua o alimentos contaminados. Las enfermedades diarreicas son un grave problema de salud pública y aunque esta problemática afecta tanto a niños como a adultos, ésta es una causa importante de morbilidad y mortalidad en lactantes y niños pequeños. Los países de bajos y medianos ingresos en África, Asia y América Latina son las regiones más afectadas por enfermedades diarreicas, debido principalmente a las malas condiciones de vida (suministro inadecuado de agua, mala higiene ambiental y saneamiento, y educación insuficiente). Además, esta bacteria es la responsable de aproximadamente el 90 % de las infecciones del tracto urinario y en ocasiones puede causar peritonitis en adultos. La resistencia de *E. coli* a múltiples antimicrobianos está muy generalizada (Gomes y col., 2016).

Por lo tanto, dada la necesidad de determinar el efecto que los flavonoides antioxidantes pudieran tener sobre la actividad antibacteriana de GEN, se investigó el efecto de la asociación de los flavonoides y el antibiótico sobre cepas clínicas y de referencia de *E. coli* y *S. aureus*, con el fin de determinar si Q y L interfieren o no con la actividad antibacteriana de GEN sobre estas bacterias.

7.2. Objetivos

- ✚ Determinar si los flavonoides activos, como agentes protectores frente al estrés oxidativo inducido por GEN, poseen actividad antibacteriana *per se* y/o efectos sobre la actividad antibacteriana de dicho antibiótico sobre cepas clínicas y de referencia de *S. aureus* y *E. coli*.
- ✚ Establecer el tipo de interacción existente entre los flavonoides y GEN desde el punto de vista de sinergismo, antagonismo y/o aditivismo, cuando sea posible.

7.3. Metodología

7.3.1. Cepas bacterianas

Las suspensiones bacterianas de *S. aureus* y *E. coli* fueron obtenidas a partir de cultivos de 18 h en Agar Tripeína Soya (ATS, Britania).

Se emplearon cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922, ambas sensibles a GEN, CIP y CMP. Así como también cepas aisladas y biotipificadas a partir de muestras clínicas por los laboratorios de Bacteriología del Hospital Tránsito Cáceres de Allende de la Ciudad de Córdoba, Argentina: una cepa clínica de *S. aureus* resistente a GEN y CIP y una cepa clínica de *E. coli* resistente a GEN y CIP.

7.3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de flavonoides

La actividad antibacteriana de Q y L se evaluó utilizando el método de dilución de tubo estándar en caldo Mueller-Hinton (MH, Britania), método en el cual el microorganismo es expuesto a una serie de diluciones del compuesto en estudio. Se seleccionaron 4 ó 5 colonias de cada cepa procedentes de cultivos de 18 h sobre Agar Tripteina Soya (ATS, Britania) y se inocularon en caldo Mueller-Hinton comparando la turbidez con el tubo 0,5 de la escala de Mc Farland, posteriormente el inóculo fue ajustado a 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Los flavonoides fueron disueltos en caldo MH utilizando 10 % de EtOH como co-solvente, mientras que el antibiótico se disolvió en buffer salino de fosfato (PBS). Se realizaron diluciones seriadas 1/2 entre 0,25 y 125 $\mu\text{g/mL}$, y posteriormente se añadió la suspensión bacteriana (0,5 mL) a cada tubo para dar un volumen total de 1 mL.

El crecimiento bacteriano se observó por turbidimetría a las 18 h de incubación a 37 °C, siguiendo las indicaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Wayne, 2010). Se consideró como la CIM a la menor concentración del compuesto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Se usaron como controles negativos los caldos libres de flavonoides y se obtuvieron recuentos bacterianos viables

para muestras de control por medio de diluciones seriadas en placas de agar Tripteina Soya, seguido de incubación aerobia a 37 °C durante 18 h para *E. coli* y *S. aureus*.

7.3.3. Evaluación de la interacción entre GEN y los flavonoides por el método del Tablero de Ajedrez.

La interacción entre los flavonoides y GEN se evaluó mediante el método de tablero de ajedrez y cuando fue posible se calculó el ICIF de la combinación de los flavonoides y el antibiótico (Eliopoulos y Moellering, 1996). La inhibición del crecimiento bacteriano resultante de las interacciones se determinó mediante la prueba de dilución en caldo y las concentraciones de cada agente ensayado utilizado en las combinaciones, correspondieron a diluciones en serie 1/2 conteniendo sus valores de CIM. Para ello, a cada tubo se le agregó 0,5 mL de antibiótico, flavonoide o la combinación de ambos y posteriormente se adicionó la suspensión bacteriana (0,5 mL) para dar un volumen total de 1 mL. Las concentraciones de GEN ensayadas variaron entre 0,004 y 2048 µg/mL dependiendo del valor de la CIM de GEN en cada cepa bacteriana, mientras que las concentraciones evaluadas de los flavonoides abarcaron un rango de 0,25 a 125 µg/mL. La CIF de cada agente se calculó mediante la inhibición completa del crecimiento del microorganismo en el tubo de combinación.

7.4. Resultados y Discusión

7.4.1. Determinación de la actividad antibacteriana de los flavonoides quercetina y luteolina.

Al evaluar la actividad antibacteriana de los flavonoides mediante la determinación de sus valores de CIM en las cepas ATCC y clínicas de *E. coli* y *S. aureus*, los datos revelaron que Q no manifestó actividad antibacteriana en ninguna de las cepas evaluadas dado que a la máxima concentración de estudio no se logró una inhibición visible del crecimiento bacteriano (Tabla 7.1).

Por otro lado, L manifestó un valor de CIM igual a la máxima concentración de ensayo (125 µg/mL) en ambas cepas ATCC, mientras que en las cepas clínicas L no demostró actividad antibacteriana.

Tabla 7.1: Valores de CIM de Q y L expresados en µg/mL.

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> clínica	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> clínica
Quercetina	> 125	>125	>125	>125
Luteolina	125	>125	125	>125

Es decir que, de ambos flavonoides, sólo L manifestó poseer actividad antibacteriana por sí misma en las cepas ATCC, mientras que Q no demostró actividad antibacteriana en ninguna de las cepas de estudio.

7.4.2. Efecto de los flavonoides quercetina y luteolina sobre la actividad antibacteriana de GEN

Mediante el ensayo de tablero de ajedrez se logró determinar el efecto de la combinación de los flavonoides y GEN sobre las cepas ATCC y clínicas de *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados se muestran en representaciones gráficas del tablero de ajedrez, en las cuales el color negro representa zonas de crecimiento bacteriano, mientras que la zona de color naranja o verde representa ausencia de crecimiento.

La representación gráfica del tablero de ajedrez es una tabla constituida por 10 filas y 10 columnas en la cuales cada cuadro combina distintas concentraciones del antibiótico y los flavonoides. Cada fila de abajo hacia arriba contiene concentraciones crecientes del antibiótico mientras que, cada columna de izquierda a derecha contiene concentraciones crecientes del flavonoide de interés. La primera columna, en la cual al inóculo bacteriano se le adicionó solo el antibiótico, brinda la información de la CIM del mismo, la cual se corresponde con el primer tubo sin crecimiento (primer cuadro de color en dicha columna), mientras que la última fila, en la cual se adicionó el flavonoide al inóculo de trabajo en ausencia del antibiótico, indica la CIM del flavonoide (primer cuadro de color en dicha fila) (Figura 7.1 A). Una disminución en el valor de la CIM del antibiótico indicaría un efecto favorable sobre su actividad antibacteriana dado que la cepa bacteriana se vuelve más sensible a dicho antibiótico en presencia del flavonoide (Figura 7.1 B). Por otro lado, un aumento en el valor de la CIM del antibiótico, tras ser combinado con el flavonoide, indica un efecto desfavorable sobre la actividad antibacteriana dado que la sensibilidad bacteriana frente a dicho antimicrobiano disminuye (Figura 7.1 C).

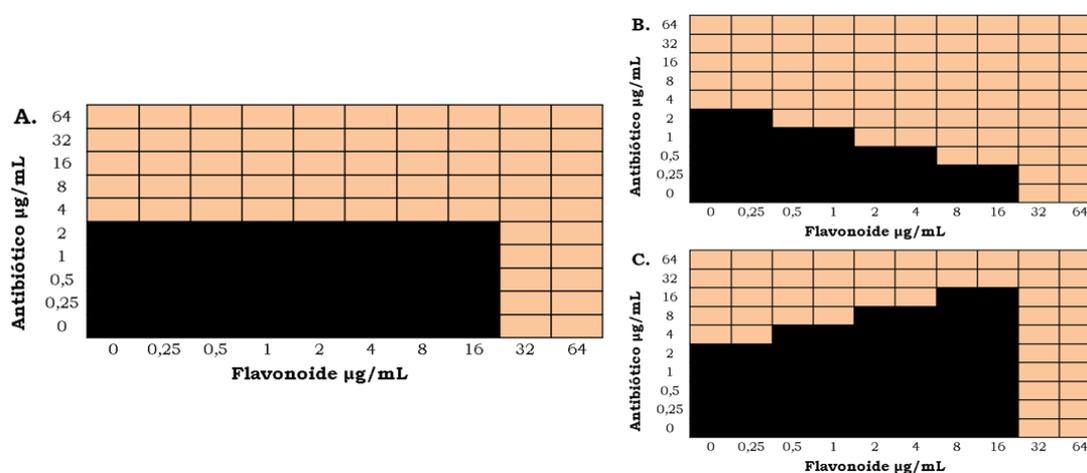


Figura 7.1: A. Representación gráfica del tablero de ajedrez. B. Efecto favorable sobre la actividad antibacteriana del antibiótico. C. Efecto desfavorable sobre la actividad antibacteriana del antibiótico.

3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona – quercetina

En las cepas clínicas de *E. coli*, se observó que a una concentración de 1 µg/mL de Q, la sensibilidad bacteriana frente a GEN disminuyó en 1 dilución, dado que el valor de la CIM del antibiótico aumentó 2 veces respecto a la CIM individual, cambiando su valor de 128 a 256 µg/mL. Por el contrario, la combinación de Q+GEN sobre la cepa clínica de *S. aureus* provocó un aumento en la susceptibilidad bacteriana disminuyendo el valor de la CIM del antibiótico 2 diluciones respecto a su CIM individual (cambió de 64 a 16 µg/mL es decir, disminuyó 4 veces la concentración) a la mayor concentración evaluada de Q (Figura 7.2 A y B).

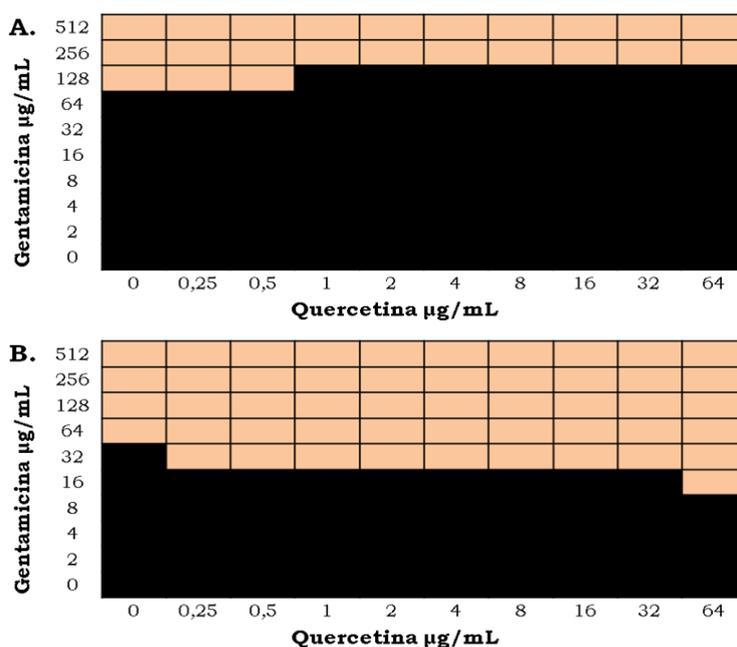


Figura 7.2 Interacción entre Q y GEN frente a: A. *E. coli* clínica. B. *S. aureus* clínica.

Por otra parte, en las cepas ATCC se observó que frente a *E. coli*, Q a la menor concentración evaluada, provocó una disminución de 1 dilución en la sensibilidad bacteriana frente a GEN, aumentando el valor de la CIM del antibiótico 2 veces con respecto a su CIM individual (cambió de 1 µg/mL a 2 µg/mL). Mientras que, en la cepa de *S. aureus* la combinación con Q provocó un aumento de 2 diluciones en la sensibilidad bacteriana dado disminuyó 4 veces el valor de la CIM de GEN cambiando de 4 a 1 µg/mL a la mayor concentración evaluada del flavonoide (64 µg/mL) (Figura 7.3 A y B).

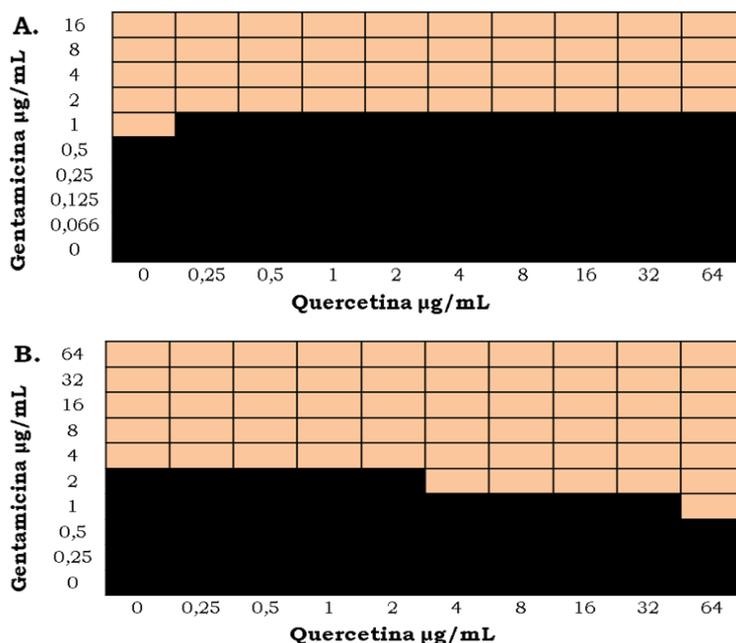


Figura 7.3: Efecto de Q sobre la actividad antibacteriana de GEN frente a: A. *E. coli* ATCC 25922. B. *S. aureus* ATCC 29213.

Si bien se observa un leve efecto en la susceptibilidad de *E. coli* frente a GEN cuando este antibiótico es combinado con el flavonoide Q, las variaciones en 1 dilución (2 veces la concentración) en el valor de la CIM se contemplan dentro del error experimental del método (Johnson y col., 2004). Por lo tanto, se considera que la combinación de Q+GEN no generaría alteraciones en la actividad antibacteriana de GEN frente a las cepas de *E. coli* ATCC y clínica, mientras que, para las cepas de *S. aureus* ATCC y clínica se observa un efecto beneficioso, ya que la susceptibilidad de las bacterias a GEN aumenta en 2 factores de dilución en presencia de Q.

Cabe aclarar que si bien se observa un aumento de la susceptibilidad de las cepas de *S. aureus*, lo cual se podría traducir como un aumento en la actividad antibacteriana de GEN frente a esta bacteria en presencia de Q, en este caso no es posible determinar el Índice CIF (parámetro que permitiría evaluar el tipo de interacción que se lleva a cabo), por no contar experimentalmente con el valor de la CIM individual de Q. Por lo tanto en este caso diremos que se observa un efecto beneficioso en la actividad antibacteriana de GEN frente a *S. aureus*, sin indicar específicamente el tipo de interacción ocuriente.

3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona – luteolina

En las cepas clínicas de *E. coli* y *S. aureus*, en las cuales L no presenta actividad antibacteriana por sí sola, la presencia de este flavonoide no produjo cambios en la susceptibilidad bacteriana frente a GEN, ya que las alteraciones en el valor de la CIM fueron de 1 dilución (Figura 7.4 A y B).

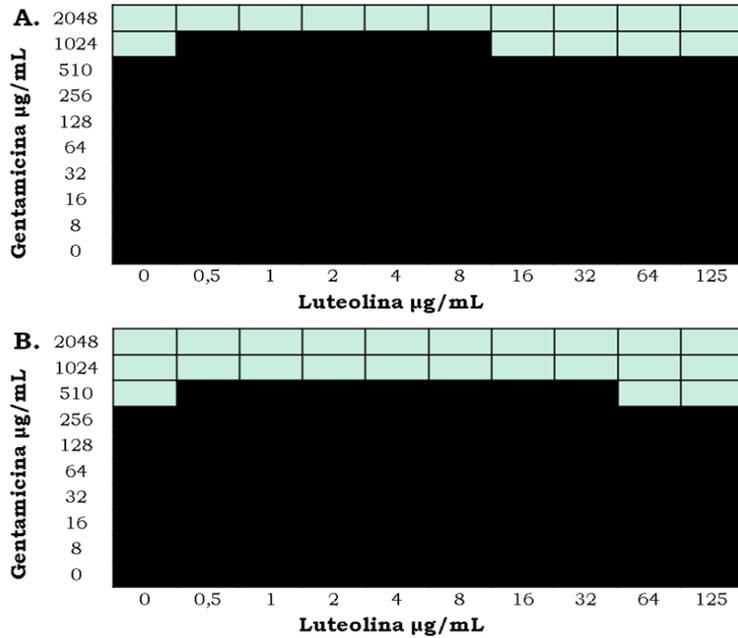


Figura 7.4: Interacción entre L y GEN frente a: A. *E. coli* clínica. B. *S. aureus* clínica.

Con respecto a la interacción L+GEN frente a las cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*, sobre las cuales L posee actividad antibacteriana *per se*, se observó en ambas cepas un aumento en la sensibilidad bacteriana frente a GEN. En *E. coli* ATCC, la CIM de GEN disminuyó 1 dilución a 0,5 µg/mL de L y 2 diluciones a 64 µg/mL del flavonoide, mientras que en la cepa de *S. aureus* ATCC el valor de la CIM disminuyó 2 diluciones a 1 µg/mL de L y 3 diluciones a 64 µg/mL del flavonoide (Figura 7.5).

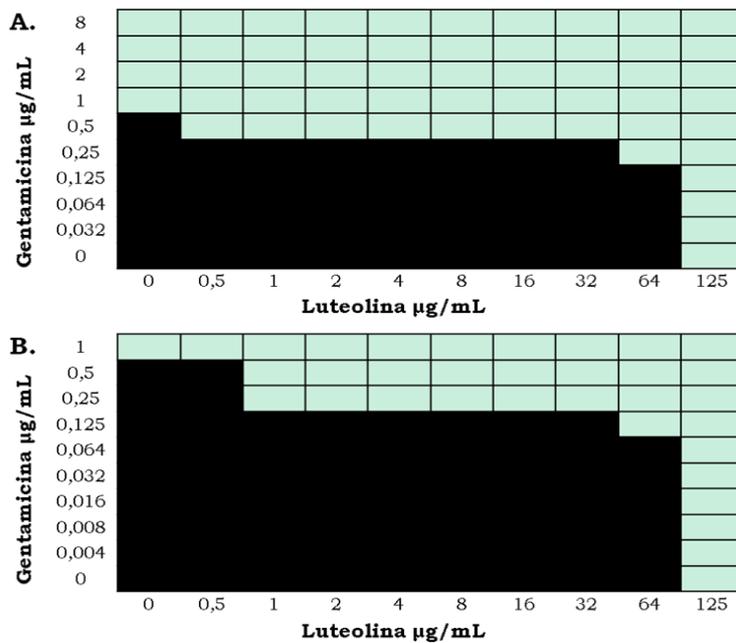


Figura 7.5: Efecto de luteolina frente a la actividad antibacteriana de GEN frente a: A. *E. coli* ATCC 25922. B. *S. aureus* ATCC 29213.

Para el caso de las cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*, en las cuales como se mencionó anteriormente L presenta actividad antibacteriana *per se*, se calcularon los valores ICIF, determinando el tipo de interacción que tiene lugar en la combinación de L+GEN sobre estas cepas bacterianas.

En la cepa de *E. coli* ATCC se observó un efecto **aditivo** (ICIF superior a 0,5), para la combinación de L+GEN cuando la CIM de GEN se redujo 2 y 4 veces (disminuyó de 1 a 0,5 y a 0,25 µg/mL, correspondientemente) en presencia de L a concentraciones de 0,5 y 64 µg/mL, respectivamente. (Figura 7.5 A, Tabla 7.2).

Para el caso de *S. aureus* ATCC, los resultados superaron las expectativas ya que se observó un efecto **sinérgico** (ICIF=0,258), entre L y GEN al ser combinados frente a dicha cepa bacteriana. Este efecto se manifestó cuando la CIM de GEN se redujo 4 veces con respecto a su CIM individual (cambió de 1 a 0,25 µg/mL) y la CIM de L se redujo 125 veces con respecto a su CIM individual (cambió de 125 a 1 µg/mL), es decir que L a una concentración de 1 µg/mL es capaz de incrementar significativamente la actividad de GEN frente a *S. aureus* ATCC. Además se observó un efecto **aditivo** (ICIF=0,637) para la combinación L+GEN cuando la concentración de GEN se redujo 8 veces por debajo de su CIM individual, disminuyendo de 1 a 0,125 µg/mL, en presencia de L a 64 µg/ml. (Figura 7.4 B, Tabla 7.2)

Tabla 7.2: Concentración inhibitoria Mínima, Concentración Inhibitoria Fraccional e Índice CIF de GEN en combinación con L en cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*.

<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>S. aureus</i> ATCC 29213		
GEN (CIM=1)			GEN (CIM=1)		
CIM _G	CIF _G	ICIF _{G+L}	CIM _G	CIF _G	ICIF _{G+L}
0,5	0,5	0,504	0,25	0,25	0,258
0,25	0,125	0,762	0,125	0,125	0,637

CIM_G= CIM de gentamicina en presencia de luteolina. *CIF_G*= CIF de gentamicina en presencia de luteolina. *ICIF_{G+L}*= ICIF de la combinación.

Es decir que L incrementa significativamente la actividad antibacteriana de GEN frente a las cepas ATCC estudiadas, mientras que en las cepas clínicas resistentes no se observa una alteración de la sensibilidad frente a GEN, cuando el antibiótico es combinado con dicho flavonoide.

La actividad antimicrobiana de los polifenoles presentes en plantas medicinales ha sido ampliamente investigada contra una extensa gama de microorganismos. Entre los polifenoles, los flavonoides y los taninos recibieron mayor atención debido a su amplio espectro y mayor actividad antimicrobiana en comparación con otros polifenoles, y al hecho de que la mayoría de ellos son capaces de suprimir varios factores de virulencia microbiana (tales como inhibición de la formación de biofilm, reducción de la

adhesión de los ligandos del huésped y neutralización de toxinas bacterianas) demostrado algunos de ellos sinergismo con distintos antibióticos (Daglia, 2012).

En relación a la actividad antibacteriana de los flavonoides evaluados, los resultados obtenidos en cuanto a la actividad manifestada por L en las cepas ATCC, estaría en concordancia con estudios anteriores en los cuales se determinó que este flavonoide posee actividad antibacteriana por sí mismo contra cepas de *E. coli* y *S. aureus* ATCC, determinándose valores de CIM entre 50–125 µg/mL, mientras que en cepas resistentes de *E. coli*, tal y como cepas amoxicilino resistentes, el valor de la CIM se encuentra en valores ≥ 200 µg/mL (Cottiglia y col., 2001; Eumkeb y col., 2012; Joung y col., 2016; Lv y col., 2009; Miski y col., 1983).

Existen estudios realizados en los que se evaluó el efecto de la combinación de metabolitos naturales con diversos antimicrobianos con el fin de mejorar la actividad antibacteriana de los mismos en cepas de *E. coli* y *S. aureus* tanto sensibles como resistente a diversos antibióticos (Amin y col., 2015; Daglia, 2012; Dey y col., 2016; Eumkeb y col., 2010; Hemaiswarya y col., 2008; Kyaw y col., 2012; Lee y col., 2008). Además algunos estudios en este sentido se han realizado con los flavonoides L y Q, combinando estos compuestos con distintos antibióticos, frente a cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas manifestando efectos beneficiosos en muchas de ellas (Amin y col., 2016; Eumkeb y col., 2012; Kyaw y col., 2012; Rizzo y col., 2014). Sin embargo, si bien hay un estudio de la combinación de Q y GEN, el mismo no fue realizado en cepas de *E. coli* y *S. aureus* (Dey y col., 2016), mientras que la combinación L+GEN fue estudiada recientemente en cepas de *S. aureus* meticilino resistentes y sensibles observándose efecto sinérgico y aditivo (Joung y col., 2016), no obstante no existen hasta el momento reportes de estudios realizados con esta combinación en las cepas de *E. coli* y *S. aureus* ATCC y clínicas evaluadas en la presente tesis doctoral.

El sinergismo y aditivismo observado en la combinación de L con GEN sobre *E. coli* y *S. aureus* ATCC son muy alentadores, ya que L además de manifestar un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por GEN en células humanas, es capaz de aumentar la actividad antibacteriana de este fármaco.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los estudios realizados con Q manifiestan que si bien este flavonoide no posee actividad antibacteriana *per se* frente a las distintas cepas de *S. aureus*, al combinarlo con GEN ocurre un aumento de la susceptibilidad bacteriana frente a este antibiótico tanto en la cepa ATCC como la cepa clínica. Estos datos brindan importante información en lo referente al comportamiento de este flavonoide, dado que los mismos se complementan con reportes de estudios previos en los cuales se ha documentado que si bien Q no posee relevante actividad antibacteriana sobre distintas cepas de *S. aureus* (CIM de 512 y 1024 µg/mL), en combinación con rifampicina, minociclina y ácido fusídico genera un importante efecto sinérgico (Kyaw y col., 2012; Lin y col., 2008).

Por lo tanto los resultados obtenidos demostraron que tanto Q como L, flavonoides capaces de disminuir el estrés oxidativo inducido por GEN, no disminuyen la actividad antibacteriana de este fármaco. Por el contrario se observó un efecto beneficioso en la combinación de Q con GEN sobre *S. aureus* tanto sensible como resistente al antibiótico, mientras que para la combinación de L y GEN se observó un efecto aditivo de la combinación en la cepa de *E. coli* ATCC y un efecto sinérgico en la cepa de *S. aureus* ATCC.

7.5. Conclusiones Parciales

El presente estudio permitió determinar el efecto de los flavonoides activos, en cuanto a la disminución del estrés oxidativo inducido por GEN en células del huésped, sobre la actividad antibacteriana de dicho antibiótico frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*.

De los dos flavonoides estudiados, a las concentraciones evaluadas, sólo L manifestó poseer actividad antibacteriana por sí mismo, frente a las cepas ATCC sensibles a GEN tanto de *E. coli* como de *S. aureus*. Mientras que Q no manifestó poseer actividad antibacteriana en ninguna de las cepas evaluadas.

La combinación de Q y GEN no generó cambios en la actividad antibacteriana de GEN contra las cepas de *E. coli*, mientras que para las cepas de *S. aureus* se observó un efecto beneficioso, ya que la susceptibilidad de las bacterias a GEN aumenta en presencia de Q.

En cuanto a la combinación de L y GEN, la presencia del flavonoide no produjo cambios en la sensibilidad de las cepas clínicas resistentes a GEN de *E. coli* y *S. aureus*, mientras que en las cepas ATCC sensibles de estas especies bacterianas, la combinación manifestó efectos beneficiosos sobre la actividad antibacteriana, ya que demostró un efecto **aditivo** frente a *E. coli* ATCC y **sinérgico** frente a *S. aureus* ATCC. Es decir, que L manifestó mayor potencial como agente terapéutico capaz de favorecer la actividad antibacteriana de GEN frente a las cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*, lo que refuerza la posibilidad de disminuir el estrés oxidativo generado en células del huésped y al mismo tiempo potenciar la actividad de GEN sobre las células bacterianas ya que L puede aumentar la susceptibilidad de dichas bacterias a la acción de GEN.

Por lo tanto, tanto Q como L (los cuales demostraron un marcado efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por GEN, tanto *in vitro* como *in vivo*), no disminuirían la actividad antibacteriana del mismo en la mayoría de las cepas evaluadas y beneficiarían dicha actividad antibacteriana en cepas sensibles y resistentes de *S. aureus* en el caso de Q, y en cepas ATCC en *E. coli* y *S. aureus* en el caso de L.

7.6. Bibliografía

- Albesa I., Becerra M.C., Battán P.C., Páez P.L, 2004. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2), 605–609.
- Amin, M.U., Khurram, M., Khattak B., Khan, J., 2015. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 15–59.
- Amin, M.U., Khurram, M., Khan, T.A., Faidah, H.S., Ullah, Shah, Z., Ur Rahman, S., Haseeb, A., Ilyas, M., Ullah, N., Umar Khayam, S.M., Iriti, M., 2016. Effects of luteolin and quercetin in combination with some conventional antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* 17(11).
- Becerra, M.C., Albesa, I., 2002. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (4), 1003–1007.
- Belenky, P., Ye, J.D., Porter, C.B., Cohen, N.R., Lobritz, M.A., Ferrante, T., Jain, S., Korry, B.J., Schwarz, E.G., Walker, G.C., Collins, J.J., 2015. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell Rep.* 13 (5), 968–80.
- Betts, J.W., Sharili, A.S., Phee, L.M., Wareham, D.W., 2015. In vitro activity of epigallocatechin gallate and quercetin alone and in combination versus clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* 78, 2145–2148.
- Chung, P.Y., Navaratnam, P., Chung, L.Y., 2011. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 10, 25.
- Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Casu, M., Pompei, R., Bonsignore, L., 2001. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine.* 8 (4), 302–305.
- Cushnie, T.P., Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38 (2), 99–107.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2), 174–181.
- Dey, D., Ghosh, S., Ray, R., Hazra, B., 2016. Polyphenolic secondary metabolites synergize the activity of commercial antibiotics against clinical isolates of β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother. Res.* 30 (2), 272–282.
- Dwyer, D.J., Kohanski, M.A., Collins, J.J., 2009. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 12 (5), 482–489.
- Dwyer, D.J., Collins, J.J., Walker, G.C., 2015. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55, 313–332.
- Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C. Jr., 1996. Antimicrobial combinations. Antibiotics in Laboratory Medicine (4^a Edición). Williams & Wilkins: Baltimore, USA.
- Eumkeb, G., Sakdarat, S., Siriwong, S., 2010. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine.* 18 (1), 40–45.

- Eumkeb, G., Siritwong, S., Thumanu, K., 2012. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *J. Photochem. Photobiol. B.* 117, 247–253.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive Document E. Def 1.2. *Clin. Microbiol. Infect.* 6 (9), 503–508.
- Gomes, T.A., Elias, W.P., Scaletsky, I.C., Guth, B.E., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M., Ferreira, L.C., Martinez, M.B., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* 47, 3–30.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* 15 (8), 639–652.
- Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.R., Rex, J.H., 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (3), 693–715.
- Joung, D.K., Kang, O.H., Seo, Y.S., Zhou, T., Lee, Y.S., Han, S.H., Mun, S.H., Kong, R., Song, H.J., Shin, D.W., Kwon, D.Y., 2016. Luteolin potentiates the effects of aminoglycoside and β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. *Exp. Ther. Med.* 11 (6), 2597–2601.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., Collins, J.J., 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 130 (5), 797–810.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., Collins J.J., 2008. Mistranslation of membrane proteins and two component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell.* 135 (4), 679–690.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (6), 423–435.
- Kyaw, B.M., Arora, S., Lim, C.S., 2012. Bactericidal antibiotic-phytochemical combinations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Microbiol.* 43 (3), 938–945.
- Lee, Y.S., Kang, O.H., Choi, J.G., Oh, Y.C., Chae, H.S., Kim, J.H., Park, H., Sohn, D.H., Wang, Z.T., Kwon, D.Y., 2008. Synergistic effects of the combination of galangin with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol.* 46 (3), 283–288.
- Lin, R.D., Chin, Y.P., Hou, W.C., Lee, M.H., 2008. The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Med.* 74 (8), 840–846.
- Liu, H.; Mou, Y.; Zhao, J.; Wang, J.; Zhou, L.; Wang, M.; Wang, D.; Han, J.; Yu, Z.; Yang, F., 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules.* 15 (11), 7933–7945.
- Liu, X., Marrakchi, M., Jahne, M., Rogers, S., Andreescu, S., 2016. Real-time investigation of antibiotics-induced oxidative stress and superoxide release in bacteria using an electrochemical biosensor. *Free Radic. Biol. Med.* 91, 25–33.

- López-Lázaro, M., 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev. Med. Chem.* 9(1), 31–59.
- Lv, P.C., Li, H.Q., Xue, J.Y., Shi, L., Zhu, H.L., 2009. Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2), 908–914.
- Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C., Mabry, T.J., 1983. Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *J. Nat. Prod.* 46 (6), 874–875.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I., 2010a. Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 303 (1), 101–105.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I., 2010b. Antioxidative mechanism protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24 (6), 771–776.
- Páez, P.L., Bazán, C.M., Bongiovanni, M.E., Toneatto, J., Albesa, I., Becerra, M.C., Argüello, G.A., 2013. Oxidative stress and antimicrobial activity of chromium(III) and ruthenium(II) complexes on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biomed. Res. Int.* 2013, 906912.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 2000. *Farmacología*. (4^a Edición). Harcourt Brace: Madrid.
- Rizzo, A., Carratelli, C.R., Losacco, A., Iovene, M.R., 2014. Antimicrobial effect of natural polyphenols with or without antibiotics on *Chlamydia pneumoniae* infection in vitro. *Microb. Drug Resist.* 20 (1), 1–10.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine.* 16 (2–3): 97–110.
- Wang, X, Zhao, X., 2009. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (4), 1395–1402.
- Wayne, PA., 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute, “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement; M100–S20 and M100 S20 Supplement”. EE.UU.



*Capítulo 8:
Efecto de flavonoides frente al estrés oxidativo
inducido por Ciprofloxacina y Cloranfenicol en
leucocitos humanos. Efecto sobre la actividad
antibacteriana.*



8.1. Introducción

Ciprofloxacina es una fluoroquinolona sintética, bactericida, de amplio espectro cuya acción proviene de la interferencia con la enzima ADN girasa, necesaria para la síntesis del ADN bacteriano. Éste antibiótico es la fluoroquinolona utilizada con mayor frecuencia en la práctica clínica siendo eficaz frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, aunque es especialmente activa contra estos últimos. Generalmente es utilizada en infecciones respiratorias, gastrointestinales, osteoarticulares e infecciones del tracto urinario. Entre los efectos secundarios más frecuentes se encuentran alteraciones gastrointestinales, fotosensibilidad con exantema cutáneo y prurito, diversos síntomas neurológicos y alteraciones del aparato locomotor (Rang y col., 2000). La dosis recomendada para la mayoría de los casos es de 250 o 500 mg cada 12 horas, pero en casos de infecciones graves la dosis puede ser aumentada hasta 750 mg cada 12 horas. La duración del tratamiento puede variar entre 7 y 14 días dependiendo de la severidad de la infección y las concentraciones plasmáticas máximas varían entre 0,5 y 3,7 µg/mL dependiendo de la dosis administrada (AEMPS, 2016; Sánchez Navarro y col., 2002)

Cloranfenicol por su parte, es un anfenicol en general bacteriostático, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas. Es un antibiótico de amplio espectro, utilizado contra microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos y rickettsias para el tratamiento de meningitis, septicemias bacterianas, fiebre tifoidea, infecciones abdominales, óseas, otitis, neumonía y sinusitis. Si bien se trata de un antibiótico de bajo costo y gran efectividad, su importante toxicidad genera que no sea un antibiótico de primera elección y que su uso se vea disminuido de manera constante en los últimos 50 años, resguardándose sólo para casos graves de meningitis y fiebre tifoidea. Los efectos secundarios más frecuentes son aquellos que afectan el sistema hematopoyético, entre ellos se encuentran anemia, trombocitopenia, granulocitopenia, anemia aplásica y alteraciones inmunológicas (OMS, 2014; Rang y col., 2000; Sweetman, 2009). La dosis recomendada para microorganismos sensibles a otros antibióticos es de 50 mg/kg/día distribuidos en 4 administraciones. La concentración plasmática pico de CMP recomendada es de 10–25 µg/mL. Dado que la toxicidad hematológica puede estar relacionada con las concentraciones séricas, no se recomienda llegar a concentraciones pico superiores a 25 µg/mL (Mendoza Patiño, 2008; OMS, 2014).

Como se señaló en el Capítulo 1, amplia bibliografía ha señalado la capacidad de ambos antibióticos de generar estrés oxidativo en diversas células humanas lo cual estaría asociado a distintos efectos secundarios generados por ellos (Hincal y col., 2003; Holt y col., 1997; Popadic y col., 2006; Saniabadi y col., 1996). Particularmente en células sanguíneas se han investigado la participación de las ERO en la toxicidad inducida por CIP y CMP, demostrándose que ambos antibióticos son capaces de inducir estrés oxidativo, manifestado en un aumento en la producción de ERO,

alteración de las defensas antioxidantes endógenas y aumento de oxidación de lípidos y proteínas, con reportes en leucocitos humanos para ambos antibióticos (Becerra y col., 2003; Eraso y Albesa, 2007; Páez y col., 2008), eritrocitos y plasma de pacientes tratados con CIP (Qin y Liu, 2013; Talla y Veerareddy, 2011) y sangre entera y células madre hematopoyéticas de sangre de cordón neonatal humano para el caso de CMP (Correa Salde y Albesa, 2009; Holt y col., 1997).

Por tal motivo, se han llevado a cabo estudios evaluando el efecto de distintas sustancias antioxidantes con el fin de contrarrestar los efectos tóxicos observados para estos antibióticos, obteniéndose diferentes resultados y algunos sumamente alentadores. Así, se observó que, N-acetilcisteína protege contra el daño en el ADN inducido por CMP en linfocitos y células de médula ósea (Yunis y col., 1986), la co-administración de vitaminas antioxidantes (alfa-tocoferol, beta-caroteno y ácido ascórbico), puede atenuar los efectos tóxicos del CMP en células hepáticas de rata (Farombi y col., 2002), y los extractos de frutos de *Eriobotrya japonica* Lindl., *Berberis buxifolia* Lam., *Ziziphus mistol* Griseb, *Prosopis alba* Griseb y un complejo de ciclodextrina:N-acetilcisteína, ejercen una acción protectora del estrés oxidativo inducido por CMP en leucocitos y eritrocitos humanos (Aiassa y col., 2016; Albrecht y col., 2010; Eraso y Albesa, 2007). En cuanto a CIP, se ha demostrado que Butilhidroxitolueno, un antioxidante sintético, es capaz de evitar la fototoxicidad cutánea inducida por CIP en ratas (Wagai y Tawara, 1991), vitamina E protege contra el estrés oxidativo inducido por CIP en astrocitos de rata (Gürbay y col., 2007), quercetina es capaz de disminuir el daño hepático y renal, asociado a un aumento de estrés oxidativo, generado por CIP en ratas Wistar (Elbe y col., 2016; Taslidere y col., 2016), y la administración de melatonina es capaz de proteger contra el deterioro de los marcadores nefrotóxicos y el aumento del estrés oxidativo en ratas tratadas con CIP (Shaki y col., 2016). Sin embargo, no existen estudios realizados con flavonoides en los que se evalúe el efecto de los mismos sobre el estrés oxidativo inducido por estos antibióticos a nivel sistémico.

Por otra parte, también se ha demostrado que tanto CIP como CMP son antibióticos capaces de inducir estrés oxidativo en células bacterianas, con reportes de ellos en distintas cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Específicamente, se ha observado que CIP induce un incremento de estrés oxidativo en cepas sensibles de *S. aureus*, manifestado en un incremento de $O_2^{\bullet-}$ intracelular, acompañado de peroxidación lipídica y oxidación del ADN, mientras que las cepas resistentes a este antibiótico no sufren tal estrés, debido a que las mismas desarrollan distintos mecanismos antioxidantes que las protegen del estrés oxidativo inducido por este antibiótico (Becerra y Albesa, 2002; Becerra y col., 2006; Páez y col., 2010b). Resultados similares se observaron al exponer a CIP y CMP, cepas ATCC sensibles de *E. coli* y *S. aureus*, observándose un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$, aumento de peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas en ambas bacterias con respecto a los controles (Albesa y col., 2004; Páez y col., 2011).

Es por ello que, dada la alta frecuencia de uso clínico de CIP, la restricción en el uso de CMP debido a su toxicidad, a pesar de ser un antibiótico económico y potente, y la demostrada capacidad de ambos antibióticos de inducir estrés oxidativo en células sanguíneas, se plantea la evaluación del efecto de los flavonoides activos para GEN, frente al estrés oxidativo inducido por CIP y CMP en leucocitos humanos, con el fin de comprobar si este efecto protectorio, manifestado por estos flavonoides antioxidantes, podría extenderse a diversos grupos de antibacterianos.

A su vez, tal y como se realizó con GEN, debido a la participación del estrés oxidativo inducido por CIP y CMP sobre las células bacterianas, como un mecanismo por el cual estos antibióticos ejercen su actividad, se plantea la determinación del efecto de la combinación de ambos flavonoides con CIP y CMP, sobre cepas clínicas y de referencia de *E. coli* y *S. aureus*.

8.2. Objetivos

- ✚ Indagar el efecto de aquellos flavonoides más activos como protectores frente a GEN, sobre la producción de ERO inducida por CIP y CMP, en leucocitos humanos MN y PMN.
- ✚ Evaluar si dichos flavonoides modifican la actividad antibacteriana de estos antibióticos frente a cepas clínicas y de referencia de *S. aureus* y *E. coli*.
- ✚ Establecer el tipo de interacción existente entre los flavonoides y dichos antibióticos desde el punto de vista de sinergismo, antagonismo y/o aditivismo, cuando sea posible.

8.3. Metodología

8.3.1. Obtención de leucocitos humanos y determinación de viabilidad celular

La obtención de leucocitos humanos se realizó siguiendo la metodología desarrollada en el Capítulo 4. De igual modo que con GEN, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular empleando el colorante vital Azul de Tripán, con las diferentes concentraciones empleadas para cada antibiótico. Dichas concentraciones fueron seleccionadas según una curva de producción de ERO vs. concentración para cada uno de ellos, escogiendo aquellas concentraciones en las cuales se obtuviera un importante incremento de ERO, atendiendo a su vez a que en las mismas se encuentre incluida la concentración plasmática máxima alcanzada según el régimen posológico de cada antibiótico (AEMPS, 2016; Mendoza Patiño, 2008; OMS, 2014). Las concentraciones seleccionadas fueron: 0,5; 16 y 128 $\mu\text{g/mL}$ para CIP y 1, 10 y

50 µg/mL para CMP. Las mismas fueron preparadas por disolución de CMP base (Sigma) y CIP (Parafarm) en buffer HBSS utilizando una mínima cantidad de EtOH como co-solvente en el caso de CMP y de H₂O destilada en el caso de CIP, con el fin de solubilizar la droga sólida previo al agregado del buffer.

8.3.2. Determinación de ERO intracelular mediante fluorescencia

La determinación de la producción de ERO intracelular se realizó siguiendo la metodología desarrollada en el Capítulo 4. Para ello las suspensiones de leucocitos (10⁶ células/mL) se incubaron con CIP o CMP y los flavonoides Q y L (10, 50 y 250 µM) durante 30 min a 37 °C; HBSS-albúmina 0,1 % fue utilizado en las muestras control. La fluorescencia se midió durante 30 min en intervalos de 5 min, los resultados se presentan como curvas de Unidades Relativas de Fluorescencia en función del tiempo. A su vez, se calcularon los % de inhibición de ERO, teniendo en cuenta los valores de URF, al minuto 30 de la medición.

Adicionalmente con el fin de evaluar el efecto concentración-respuesta de cada flavonoide, se trataron las células tal y como se describió anteriormente, con distintas concentraciones para cada flavonoide, con el fin de estimar el valor de CI₅₀ para cada uno de ellos. Dicho valor se determinó a las concentraciones medias utilizadas para cada antibiótico, es decir, 16 µg/mL para CIP y 10 µg/mL para CMP. Los valores de CI₅₀ se obtuvieron utilizando el programa informático OriginPro® 8 (Northampton, MA) y los mismos fueron comparados con el valor de CI₅₀ de vitamina C, utilizada como inhibidor de referencia.

8.3.3. Evaluación de la interacción entre antibióticos y flavonoides por el método del Tablero de Ajedrez.

El efecto de los flavonoides sobre la actividad antibacteriana de CIP y CMP se evaluó siguiendo la metodología desarrollada en el Capítulo 7. Para ello se utilizaron las mismas cepas bacterianas empleadas con GEN: *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922, ambas sensibles a GEN, CIP y CMP, así como también 2 cepas clínicas, *S. aureus* resistente a GEN y CIP y *E. coli* resistente a GEN y CIP. Cabe destacar que dada la potencia de acción de CMP y la baja tasa de resistencia a dicho antibiótico, no fue posible disponer de cepas clínicas resistentes al mismo. Las concentraciones de CIP ensayadas en los tableros de ajedrez variaron, según los valores de CIM de cada antibiótico en cada cepa bacteriana, de 0,004 a 2048 µg/mL; las de CMP variaron de 0,5 a 128 µg/mL y las de los flavonoides, de igual modo que en los ensayos con GEN, abarcaron un rango de 0,25 a 125 µg/mL. Las soluciones de antibióticos y flavonoides se prepararon en buffer PBS, empleándose 5 % de EtOH como vehículo en la solución madre de los flavonoides. Cuando fue posible se calculó el ICIF de la combinación de flavonoides y antibióticos. La CIF de cada agente se

calculó mediante la inhibición completa del crecimiento del microorganismo en el tubo de la combinación.

8.3.4. Análisis Estadístico

Los valores de % de inhibición para los ensayos de ERO se expresan como la media \pm D.S. Los resultados se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples utilizando GraphPad InsStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). $p < 0,05$ fue seleccionado como criterio de diferencia significativa.

8.4. Resultados y Discusión

8.4.1. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducidas por CIP y CMP en leucocitos mononucleares humanos

En leucocitos MN humanos, ninguno de los dos antibióticos de estudio generaron un incremento de las ERO, razón por la cual no se determinaron las curvas de inhibición de los flavonoides activos en este tipo de células.

8.4.2. Efecto de flavonoides sobre la producción de ERO inducidas por CIP y CMP en leucocitos polimorfonucleares humanos

Con el fin de evaluar si el importante efecto inhibitorio sobre la producción de ERO manifestado por Q y L en los ensayos con GEN, puede extrapolarse a otros antibióticos de los cuales se ha informado su capacidad de producir estrés oxidativo en células sanguíneas, se determinaron las curvas de inhibición de la producción de ERO inducidas por CIP y CMP. Se evaluó la actividad inhibitoria de Q y L, a tres concentraciones: 10, 50 y 250 μM .

Efecto de Quercetina y Luteolina sobre las ERO inducidas por Ciprofloxacina.

En leucocitos PMN, CIP a 0,5; 16 y 128 $\mu\text{g/mL}$ produjo un aumento en la producción de ERO intracelulares, alcanzando valores similares a las tres concentraciones evaluadas. Los porcentajes de incremento con respecto a los controles fueron de $21,8 \pm 2,0$ % para la concentración plasmática del antibiótico (0,5 $\mu\text{g/mL}$), y de $19,7 \pm 2,7$ y $17,3 \pm 2,5$ % respectivamente, para las concentraciones de 16 y 128 $\mu\text{g/mL}$. Cabe destacar que no hubo variaciones en cuanto a viabilidad celular de los leucocitos PMN expuestos a las tres concentraciones de CIP, con respecto a las células control. Es decir que, si bien CIP no produjo un incremento en la producción de

ERO en leucocitos MN, si lo hizo en células PMN, que como ya se discutió anteriormente son células con mayor capacidad de respuesta ante distintos estímulos inductores de ERO. Este aumento en la producción de especies reactivas se condice con estudios realizados en neutrófilos humanos en los cuales se documentó que CIP es capaz de generar un aumento en la producción de ERO en dichas células (Becerra y col., 2003).

En cuanto al efecto de los flavonoides de estudio sobre estas ERO inducidas por CIP, Q manifestó un importante efecto inhibitorio de la producción de ERO a las tres concentraciones de ensayo (10, 50 y 250 μM), observándose una disminución de dichas especies por debajo del nivel basal en todos los casos (Figura 8.1).

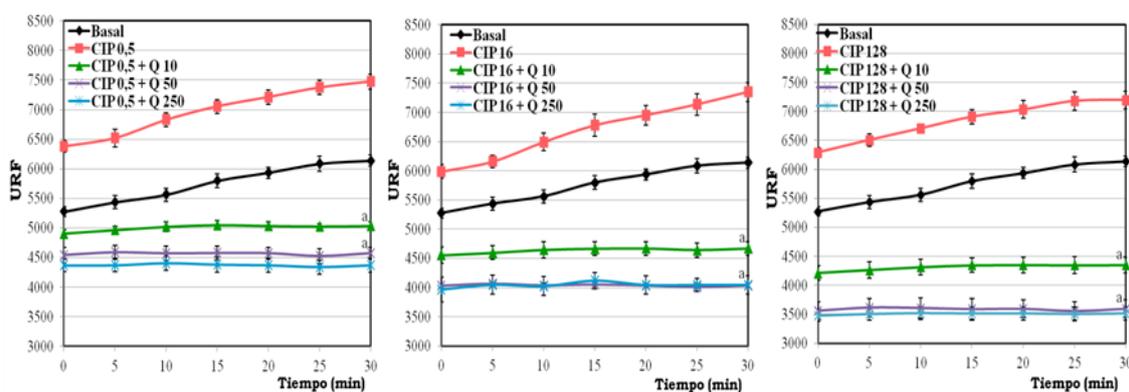


Figura 8.1: Efecto de Q sobre la producción de ERO mediada por CIP a 0,5; 16 y 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en leucocitos PMN Humanos. ^a $p < 0,001$ vs. GEN.

Si bien la concentración de 10 μM del flavonoide manifestó menor actividad con respecto a las concentraciones de 50 y 250 μM , que demostraron % de inhibición similares entre sí, en todos los casos, dichos porcentajes inhibitorios superan ampliamente el 100 %, alcanzando valores máximos cercanos al 340 % de inhibición de ERO (Tabla 8.1).

Tabla 8.1: Porcentajes de inhibición de Q sobre la producción de ERO mediada por CIP en leucocitos PMN humanos. ^a $p < 0,01$ vs. 50 μM ; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$ vs. 250 μM .

% Inhibición de producción de ERO			
Q (μM)	CIP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	0,5	16	128
10	182,7 \pm 5,0 ^{ac}	221,4 \pm 9,6 ^{ab}	268,2 \pm 12,9 ^{ac}
50	217,2 \pm 7,5	273,9 \pm 2,8	339,5 \pm 14,6
250	232,4 \pm 8,8	272,7 \pm 13,0	347,1 \pm 10,7

Para el caso de L, el segundo flavonoide de interés, éste, de igual modo que Q, demostró un potente efecto inhibitorio de la producción de ERO inducidas por CIP

en leucocitos PMN, observándose una significativa disminución de la producción de ERO por debajo del nivel basal en todos los casos (Figura 8.2).

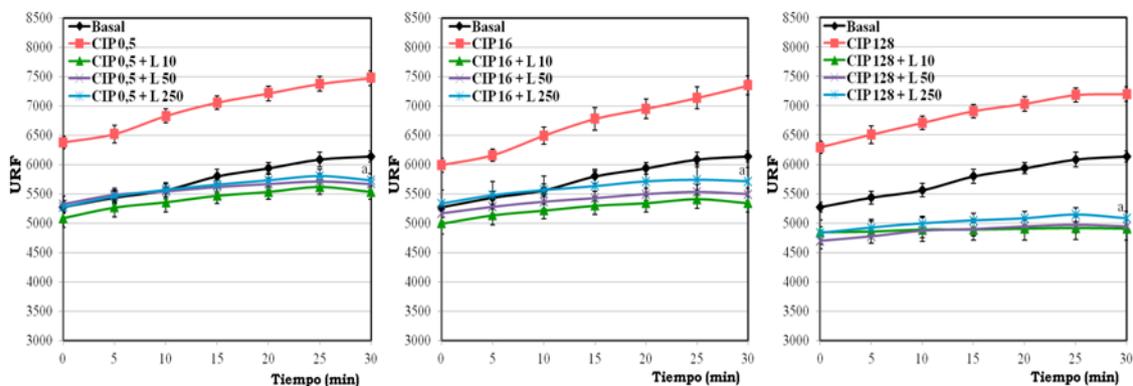


Figura 8.2: Curvas de producción de ERO de la combinación L y CIP en leucocitos PMN humanos. ^ap<0,001 vs. GEN.

Además, tal como se observó en los estudios con GEN, las tres concentraciones de L manifestaron porcentajes de inhibición similares, y si bien en todos los casos dichos porcentajes superan el 100 %, los valores obtenidos fueron menores a los alcanzados por Q (Tabla 8.2).

Tabla 8.2: Porcentajes de inhibición de L sobre la producción de ERO inducida da por CIP en leucocitos PMN humanos. *p*>0,05 entre las distintas concentraciones de L.

% Inhibición de producción de ERO			
L (µM)	CIP (µg/mL)		
	0,5	16	128
10	145,2 ± 9,6	159,4 ± 11,4	192,2 ± 14,4
50	134,8 ± 4,4	148,3 ± 1,8	189,4 ± 15,8
250	130,3 ± 12,1	131,8 ± 17,8	179,3 ± 5,8

Por lo tanto, Q y L, manifestaron una importante actividad inhibitoria de las ERO inducidas por CIP, siendo mayores los % de inhibición obtenidos con Q. Sin embargo, dado que ambos manifestaron porcentajes superiores al 100 % a la mínima concentración de ensayo y ante la necesidad de comparar dichos efectos con el inhibidor de referencia, vitamina C, se procedió a determinar los valores de CI₅₀ a la concentración media utilizada de CIP, es decir 16 µg/mL.

🔗 Comparación CI₅₀ de flavonoides con el inhibidor de referencia (vitamina C)

Tras estimar los valores de CI₅₀ para cada flavonoide aglicón y compararlos con el valor de CI₅₀ estimado para vitamina C, se observa una importante actividad inhibitoria de la producción de ERO inducidas por CIP a 16 µg/mL por parte de

ambos flavonoides, manifestando mayor actividad que la del inhibidor de referencia (Figura 8.3).

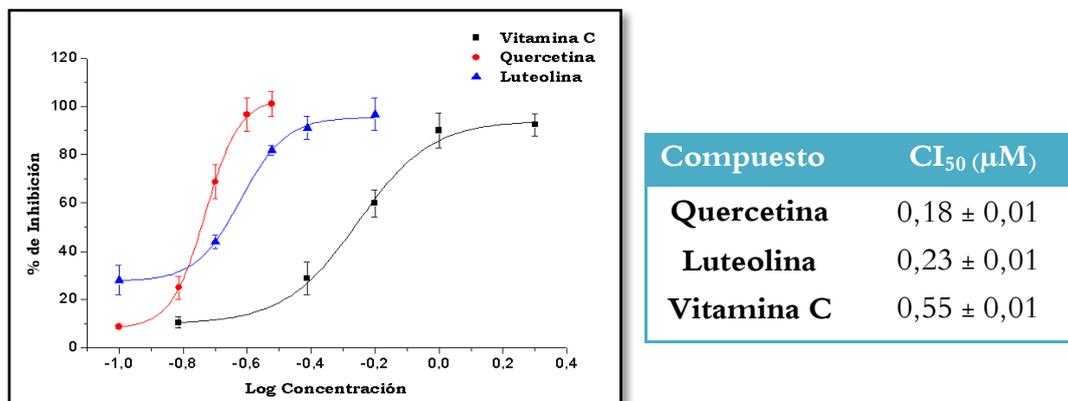


Figura 8.3: Valores de CI_{50} para flavonoides y vitamina C frente a las ERO inducidas por CIP a 16 μg/mL en leucocitos PMN humanos.

Tal y como se observó en los ensayos con GEN, Q nuevamente manifiesta una actividad mayor a L en leucocitos PMN, pero en este caso ambos presentan valores de CI_{50} menores al inhibidor de referencia. Luteolina demostró un valor de CI_{50} 2 veces menor a vitamina C, mientras que el valor estimado para Q fue 3 veces menor que éste último, a una concentración de CIP de 16 μg/mL, la cual es 32 veces mayor a las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración de dosis terapéuticas de este antibiótico (0,5 μg/mL), lo cual podría dar un indicio de la posibilidad de incrementar las dosis de este antibiótico con alta frecuencia de resistencia bacteriana, sin generar un aumento en la producción de estrés oxidativo en leucocitos humanos.

Por lo tanto, los flavonoides evaluados Q y L, demostraron una importante actividad inhibitoria de las ERO producidas por CIP, siendo esta actividad mayor al inhibidor de referencia y siendo Q el más potente de ambos flavonoides. Nuevamente debemos mencionar que ambos flavonoides aglicones presentan los principales requerimientos estructurales para la actividad antioxidante en flavonoides lo cual sería responsable de la importante actividad observada.

🌀 Efecto de Quercetina y Luteolina sobre las ERO inducidas por Cloranfenicol.

Cloranfenicol a las tres concentraciones de ensayo, 1, 10 y 50 μg/mL, manifestó un incremento en la producción de ERO en leucocitos PMN humanos. Este aumento de especies reactivas fue de $36,3 \pm 3,7\%$ para la concentración de 1 μg/mL; $44,5 \pm 5,4\%$ para 10 μg/mL y $31,3 \pm 0,9\%$ para la máxima concentración de CMP evaluada, 50 μg/mL. Es decir que se observa una respuesta bifásica ya que ocurre un incremento de la producción de ERO dependiente de la concentración alcanzando la máxima producción a 10 μg/mL, con posterior decaimiento hacia la máxima

concentración evaluada de CMP. Si se tienen en cuenta los ensayos en cuanto a la viabilidad celular llevados a cabo con este antibiótico, se observó que si bien no hubo alteraciones en la viabilidad en células expuestas a 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMP, a la máxima concentración de CMP, 50 $\mu\text{g/mL}$, ocurre una disminución de un 15 % de la viabilidad celular respecto al control, obteniéndose valores de $91,9 \pm 2,9$ % para la células control y un $76,6 \pm 2,5$ % de viabilidad para las células expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de CMP. Por lo tanto si correlacionamos la producción de ERO con la viabilidad celular, se observa que a las concentraciones en las que se manifiesta un aumento de ERO, la viabilidad de las células no se ve alterada, mientras que a la máxima concentración, 50 $\mu\text{g/mL}$, ocurre una disminución de la producción de ERO acompañada de un decaimiento en la viabilidad celular. Esto nos daría un indicio de la importante toxicidad de este antibiótico a dicha concentración. Este comportamiento ya fue documentado en estudios previos realizados con este antibiótico en leucocitos humanos y sangre entera, en los cuales se observa una respuesta bifásica en la producción de ERO por parte de CMP, observándose la máxima producción de ERO a concentraciones entre 4 y 13 $\mu\text{g/mL}$ de CMP (Eraso y Albesa, 2007; Páez y col., 2008; Correa Salde y Albesa, 2009).

Respecto al efecto de los flavonoides sobre la producción de ERO inducida por CPM, se observó que Q nuevamente provocó una disminución de la producción de ERO a las tres concentraciones de ensayo, manifestando valores de producción de especies reactivas por debajo del nivel basal en todos los casos (Figura 8.4).

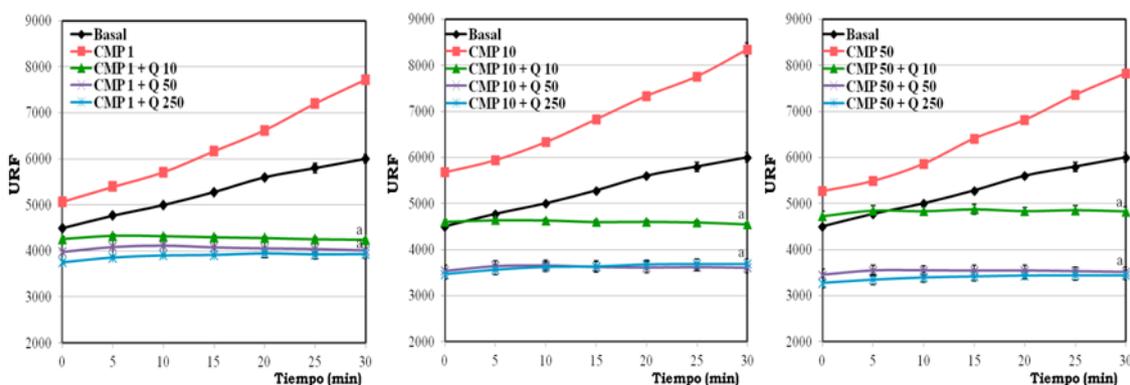


Figura 8.4: Curvas de producción de ERO de la combinación Q y CMP en leucocitos PMN humanos. ^a $p < 0,001$ vs. GEN.

Si bien al igual que con CIP, la menor concentración del flavonoide manifestó porcentajes inhibitorios menores a los obtenidos a las concentraciones media y máxima del mismo, dichos valores superan ampliamente el 100 %, logrando en este caso alcanzar valores máximos de inhibición cercanos al 230 % (Tabla 8.3).

Tabla 8.3: Porcentajes de inhibición de Q sobre la producción de ERO mediada por CMP en leucocitos PMN humanos. ^ap<0,001 vs. 50 μM; ^bp<0,01; ^cp<0,001 vs. 250 μM.

% Inhibición de producción de ERO			
Q (μM)	CMP (μg/mL)		
	1	10	50
10	202,0 ± 2,4 ^b	166,0 ± 2,9 ^{ac}	164,0 ± 9,4 ^{ac}
50	216,0 ± 10,2	201,9 ± 4,6	236,1 ± 12,2
250	220,4 ± 1,1	198,6 ± 6,1	239,9 ± 9,5

Luteolina, por su parte, nuevamente manifestó un significativo efecto inhibitorio de la producción de ERO inducidas por CMP, logrando una disminución de la producción de estas especies por debajo del nivel basal del grupo control (Figura 8.5).

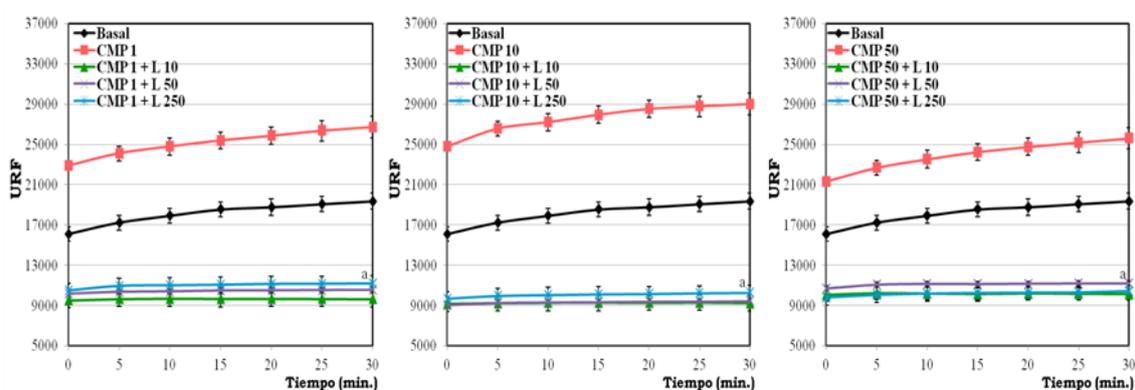


Figura 8.5: Efecto de L sobre la producción de ERO mediada por CMP en leucocitos PMN humanos. ^ap<0,001 vs. GEN.

En este caso los porcentajes de inhibición calculados son similares en las tres concentraciones de L, siendo las tres igualmente potentes y sus valores comparables a los obtenidos por Q a 50 y 250 μg/mL (Tabla 8.4).

Tabla 8.4: Porcentajes de inhibición de L sobre la producción de ERO en presencia de CMP en leucocitos PMN humanos. *p*>0,05 entre las distintas concentraciones de L.

% Inhibición de producción de ERO			
L (μM)	CMP (μg/mL)		
	1	10	50
10	232,2 ± 10,3	204,9 ± 3,8	247,9 ± 9,4
50	219,9 ± 3,4	202,7 ± 5,7	194,2 ± 4,9
250	247,9 ± 9,4	231,2 ± 6,7	243,4 ± 3,4

Por lo tanto, para CMP, ambos flavonoides demostraron un potente efecto inhibitorio de la generación ERO inducidas por dicho antibiótico, alcanzando porcentajes de inhibición similares. De igual modo como se procedió con GEN y

CIP, se estimó la CI_{50} de Q y L con el fin de poder comparar el efecto de ambos entre sí y con el inhibidor de referencia, según sus curvas concentración–respuesta.

Comparación de las CI_{50} de flavonoides y vitamina C frente a Cloranfenicol.

La determinación de las curvas concentración–respuesta y los valores de CI_{50} de los flavonoides y el inhibidor de referencia, se realizó a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CMP, concentración en la cual se observó la máxima producción de ERO sin alteraciones en la viabilidad celular. Los resultados obtenidos permitieron establecer que ambos flavonoides presentan un importante efecto inhibitorio sobre las ERO inducidas por CMP superior a vitamina C, manifestando valores de CI_{50} 3,5 veces menores que éste último, siendo los valores de CI_{50} de los flavonoides similares entre sí (Figura 8.6).

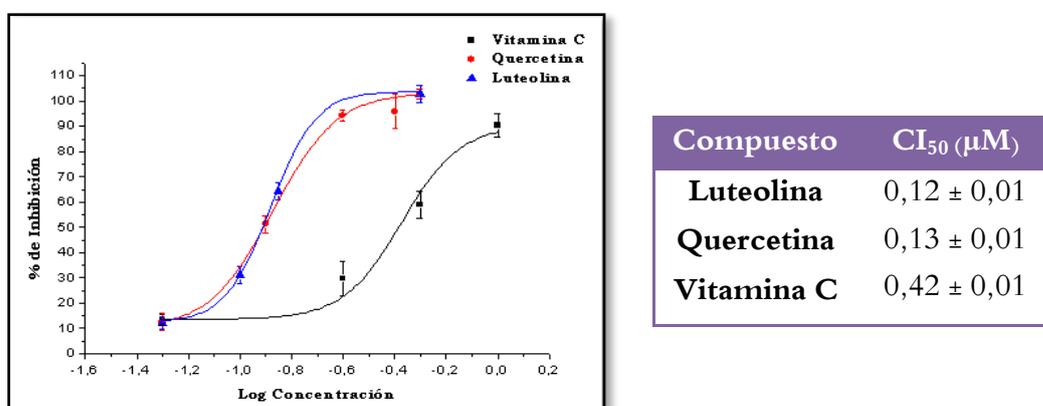


Figura 8.6: Valores de CI_{50} para flavonoides y vitamina C frente a las ERO inducidas por CMP a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en leucocitos PMN humanos.

Por lo tanto, tanto Q como L demostraron un potente efecto inhibitorio de las ERO inducidas por CMP a dosis terapéuticas (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dada la alta toxicidad a nivel sanguíneo que presenta este antibiótico, lo cual limita ampliamente su uso clínico, estos resultados darían un indicio de la posibilidad de disminuir los efectos tóxicos de este potente antibiótico lo cual permitiría dar un paso hacia su reutilización generalizada en la clínica.

8.4.3. Efecto de flavonoides sobre la actividad antibacteriana de CIP y CMP

Mediante el ensayo de tablero de ajedrez se determinó el efecto que la combinación de CIP y CMP con los flavonoides Q y L, pueda provocar en la actividad antimicrobiana de estos antibióticos sobre las cepas ATCC y clínicas de *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados se muestran en representaciones gráficas del tablero de ajedrez, en las cuales el color negro representa zonas de crecimiento bacteriano, mientras que la zona de color naranja o verde representa ausencia de crecimiento.

↻ Efecto de Quercetina y Luteolina sobre la actividad antibacteriana de Ciprofloxacina.

Al evaluar la combinación CIP+Q en las cepas clínicas de *E. coli* y *S. aureus*, se observó que en ambos casos ocurre una disminución de la sensibilidad bacteriana frente a CIP, dado que el valor de la CIM del antibiótico se incrementa con respecto al valor de su CIM individual en cada cepa.

En el caso de la cepa de *E. coli*, dicha disminución en la sensibilidad bacteriana ocurre solo en 1 factor de dilución a la mínima concentración de Q evaluada (0,25 µg/mL), mientras que para *S. aureus* el valor de la CIM de CIP aumenta en 1 dilución a 4 µg/mL de Q (se incrementa 2 veces el valor de la CIM) y en 2 diluciones a 32 µg/mL del flavonoide, siendo ésta 4 veces mayor respecto de la CIM individual, dado que cambia de 16 µg/mL a 64 µg/mL (Figura 8.7).

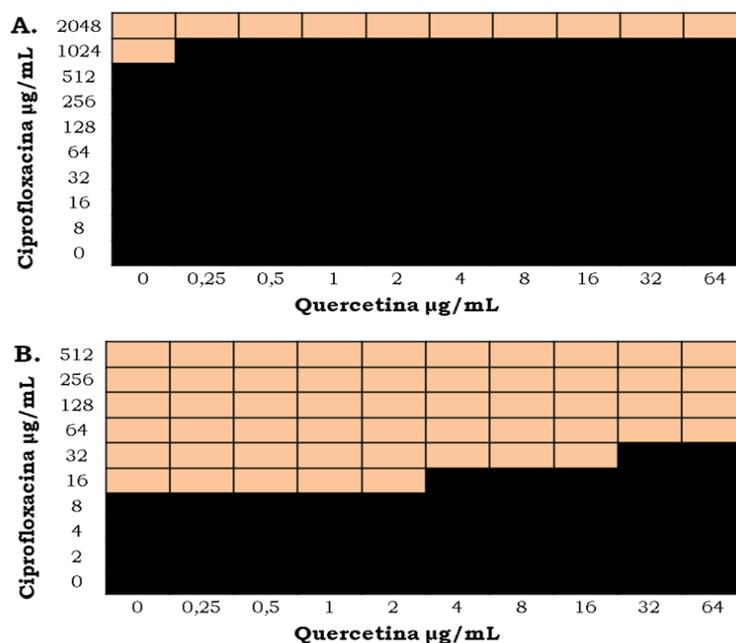


Figura 8.7: Interacción entre Q y CIP frente a: A. *E. coli* clínica resistente. B. *S. aureus* clínica resistente.

Para el caso de la cepa de *E. coli* ATCC se observa una disminución en 1 dilución de la sensibilidad bacteriana frente a CIP a 4 µg/mL de quercetina, dado que el valor de la CIM, en dichas condiciones, aumenta 2 veces respecto a la CIM individual, mientras que a la máxima concentración de flavonoide la sensibilidad bacteriana aumenta 1 dilución respecto de su CIM individual, disminuyendo 2 veces el valor de la CIM. En cuanto a la cepa ATCC de *S. aureus*, la susceptibilidad bacteriana frente a CIP aumenta en 1 dilución a 16 µg/mL de Q (Figura 8.8).

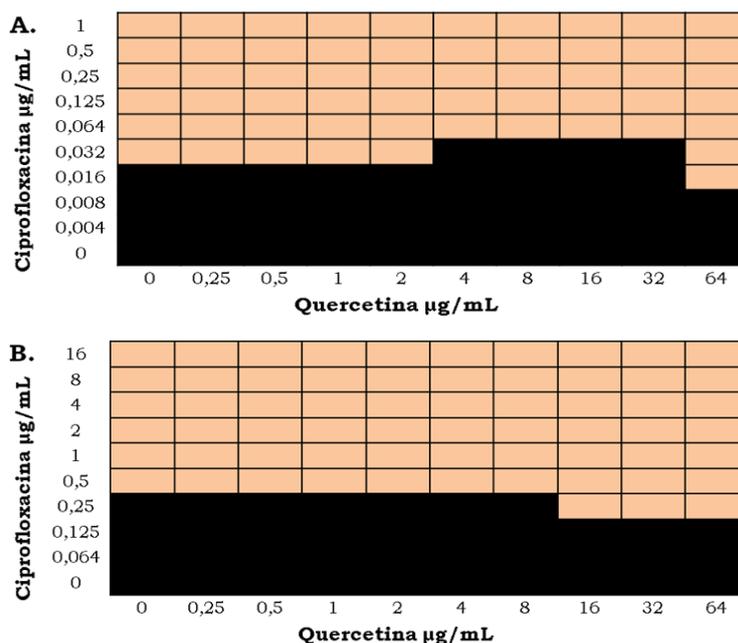


Figura 8.8: Interacción CIP+Q frente a: A. *E. coli* ATCC 25922. B. *S. aureus* ATCC 29213.

Como se mencionó en el Capítulo 7, las variaciones en un factor de dilución en el valor de la CIM se contemplan dentro del error experimental del método, por lo cual se considera que la combinación de CIP+Q no generaría alteraciones en la actividad antibacteriana de CIP frente a *S. aureus* ATCC y frente a ambas cepas de *E. coli*. No obstante, en la cepa de *S. aureus* clínica resistente ocurre un efecto desfavorable ya que se observa que a una concentración de 32 µg/mL de Q, la sensibilidad bacteriana disminuye en 2 diluciones frente a CIP, dado que el valor de la CIM se incrementa 4 veces con respecto a su CIM individual. Nuevamente debemos mencionar que para el caso de Q no es posible determinar el Índice CIP, que nos permite evaluar el tipo de interacción que se lleva a cabo, por no contar experimentalmente con el valor de la CIM individual de Q. Por lo cual, solo diremos que se manifiesta un efecto desfavorable sobre la actividad antibacteriana de CIP frente a *S. aureus* clínica a una concentración de 32 µg/mL del flavonoide.

Para el caso de L, en los ensayos con la cepa de *E. coli* clínica se manifiesta una disminución en la sensibilidad bacteriana frente a CIP a concentraciones entre 0,5 y 32 µg/mL del flavonoide, sin embargo dicha disminución es de solo 1 factor de dilución, mientras que en las cepas de *S. aureus* clínica resistente se manifiesta un aumento en la susceptibilidad bacteriana frente a CIP, ya que se observa una disminución en 1 factor de dilución del valor de la CIM, a una concentración de 16 µg/mL de L, y una disminución en 3 diluciones del valor de la CIM a 64 µg/mL del flavonoide, dado que su valor cambió de 16 a 2 µg/mL (Figura 8.9).

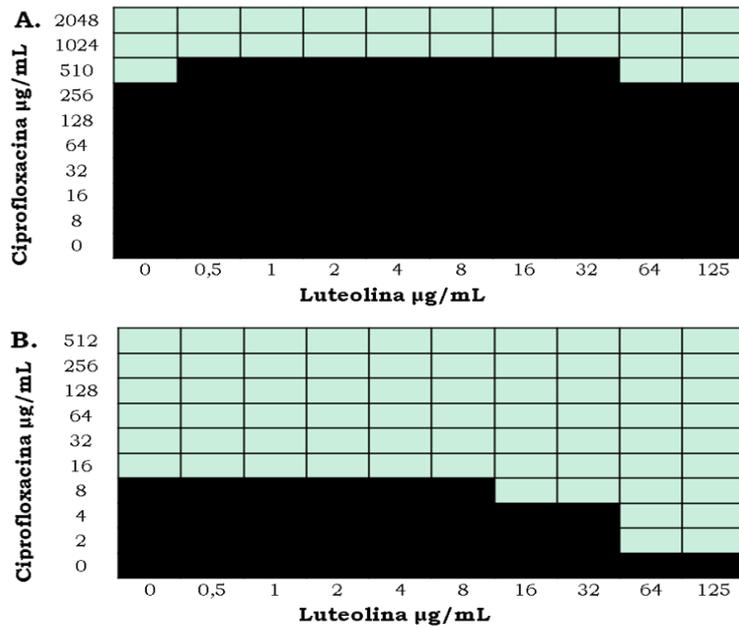


Figura 8.9: Efecto de L sobre la actividad antibacteriana de CIP frente a: A. *E. coli* clínica. B. *S. aureus* clínica.

Con respecto a los resultados obtenidos para la interacción de CIP+L frente a las cepas ATCC, se observa que en *E. coli*, la susceptibilidad bacteriana frente CIP se ve disminuida en un factor de dilución en presencia de L a 0,5 µg/mL, mientras que para *S. aureus* ocurre un aumento en la susceptibilidad bacteriana frente a CIP dado que el valor de la CIM disminuye con respecto a la CIM individual, siendo dicha disminución de 2 factores de dilución a 32 µg/mL de L y de 4 factores de dilución a 64 µg/mL del flavonoide (Figura 8.10).

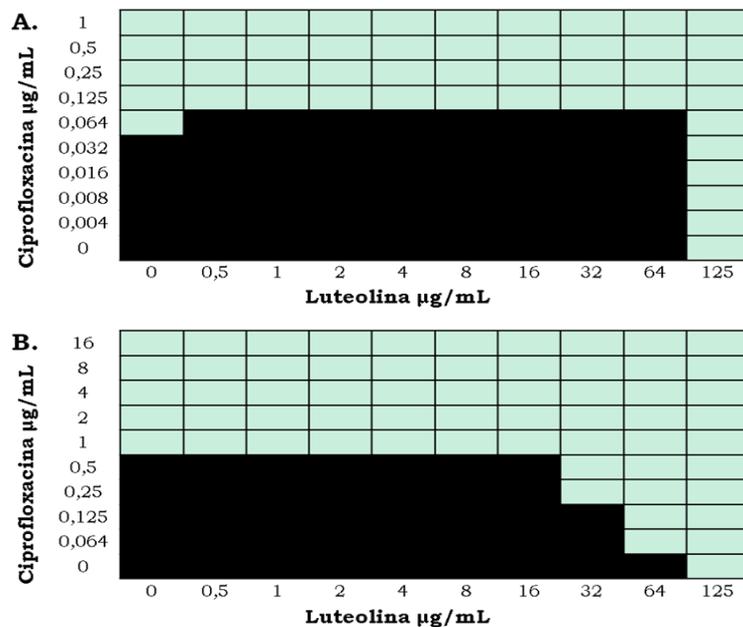


Figura 8.10: Efecto de L sobre la actividad antibacteriana de CIP frente a: A. *E. coli* ATCC 25922. B. *S. aureus* ATCC 29213.

Debido al hecho que en las cepas de *E. coli* y *S. aureus* ATCC se obtuvieron los valores de la CIM individual del antibiótico y del flavonoide (Capítulo 7, página 145), fue posible realizar el cálculo del ICIF para la combinación CIP+L en ambas cepas, lo cual nos brinda información sobre el tipo de interacción que tiene dicha combinación. Recordemos que un valor de ICIF $\leq 0,5$ se define como sinergismo; cuando el mismo se encuentra entre 0,5 y 1 se define como aditivismo, entre 1 y 4 se clasifica como indiferente y un ICIF > 4 indica antagonismo entre los componentes de la combinación (EUCAST, 2000; Johnson y col., 2004; Páez y col., 2013).

Los valores de ICIF obtenidos para la combinación CIP+L en la cepa de *E. coli* ATCC indica una interacción de tipo indiferente (ICIF=1,5), es decir que L no alteraría la actividad antibacteriana de CIP frente a dicha cepa bacteriana, lo cual está en concordancia al hecho de que las alteraciones en un factor de dilución son consideradas dentro del error experimental.

En cuanto a la cepa de *S. aureus* ATCC, la combinación CIP+L mostró dos interacciones de relevancias. Una de ellas fue del tipo **aditiva** (ICIF= 0,564), cuando la CIM de CIP se redujo 16 veces por debajo de su CIM individual (cambió de 1 a 0,064 $\mu\text{g/mL}$) en presencia de L a 64 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que la otra interacción superó nuevamente las expectativas, de igual modo a lo ocurrido con GEN, mostrando un efecto **sinérgico** (ICIF= 0,5) entre L y CIP al ser combinadas frente a dicha cepa bacteriana. Este efecto sinérgico se exhibió cuando la CIM de CIP se redujo 4 veces con respecto a su CIM individual (cambió de 1 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$) y la CIM de L disminuyó 4 veces con respecto a su CIM individual (cambió de 125 a 32 $\mu\text{g/mL}$), es decir, que a una concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$ del flavonoide, la actividad antibacteriana de CIP se vería significativamente incrementada frente a *S. aureus* ATCC (Tabla 8.5).

Tabla 8.5: Concentración inhibitoria Mínima, Concentración Inhibitoria Fraccional e Índice CIF en la combinación de L y CIP en cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*.

<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>S. aureus</i> ATCC 29213		
CIP (CIM=0,064)			CIP (CIM=1)		
CIM _{CIP}	CIF _{CIP}	ICIF _{CIP+L}	CIM _{CIP}	CIF _{CIP}	ICIF _{CIP+L}
0,125	0,5	1,5	0,25	0,25	0,5
			0,064	0,064	0,564

CIM_{CIP}= CIM de ciprofloxacina en presencia de luteolina. CIF_{CIP}= CIF de ciprofloxacina en presencia de luteolina. ICIF_{CIP+L}= ICIF de la combinación

Por lo tanto podemos concluir que **L** no alteraría la actividad antibacteriana de CIP frente a las cepas de *E. coli* ATCC y clínica, mientras que en *S. aureus* se observó un efecto beneficioso en ambas cepas bacterianas. Para el caso de la cepa de *S. aureus* clínica resistente la presencia de L provoca un aumento en la susceptibilidad bacteriana frente a CIP de 2 factores de dilución, mientras que en la cepa ATCC de *S. aureus* se

manifiestan tanto efecto **aditivo** como **sinérgico** para la combinación de CIP+L frente a dicha cepa bacteriana, lo cual supero gratamente las expectativas.

Los resultados obtenidos para L además de ser sumamente alentadores poseen gran importancia dado que no existían hasta el momento reportes en cuanto a la combinación de este flavonoide y CIP en cepas de *E. coli* y *S. aureus*.

En cuanto a la combinación de CIP con Q, los resultados obtenidos manifestaron que dicha combinación genera **indiferencia** frente a ambas cepas de *E. coli* y frente a la cepa de *S. aureus* ATCC, y un efecto **desfavorable** en la cepa clínica, a diferencia de los resultados obtenidos por otros autores quienes han reportado que la combinación CIP+Q frente a cepas de *S. aureus* clínicas sensibles y resistentes a CIP manifiestan efectos indiferentes y potenciadores (Abreu y col., 2015), mientras que se ha reportado que la presencia de Q disminuiría la actividad antibacteriana de dicho fármaco en una cepa clínica de *E. coli* sensible a CIP, (Smirnova y col., 2012). Si bien existen discrepancias entre los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis y los resultados obtenidos por otros autores, hay que tener en cuenta que los estudios fueron realizados en distintas cepas clínicas, las cuales pueden diferir en su comportamiento.

De modo que, tanto Q como L, son flavonoides capaces de disminuir, en mayor medida que el inhibidor de referencia (vitamina C), el estrés oxidativo inducido por CIP en leucocitos PMN humanos sin alterar la actividad antibacteriana de dicho fármaco frente a las cepas de *E. coli*, mientras que para la cepa de *S. aureus* clínicas si bien Q provocó un efecto desfavorable, L causó un efecto beneficioso sobre la actividad antibacteriana de CIP observándose además alentadores efectos de aditivismo y sinergismo para la combinación CIP+L en las cepas de *S. aureus* ATCC.

Efecto de Quercetina y Luteolina sobre la actividad antibacteriana de Cloranfenicol.

El estudio del efecto de los flavonoides Q y L sobre la actividad antibacteriana de CMP se llevó a cabo en las mismas cepas bacterianas utilizadas para GEN y CIP: *E. coli* y *S. aureus* ATCC (sensibles a GEN y CIP) y *E. coli* y *S. aureus* clínicas (resistentes a GEN y CIP), debido a que dada la potencia de acción de CMP y la baja tasa de resistencia a dicho antibiótico, no fue posible disponer de cepas resistentes al mismo.

En las cepas de *E. coli* y *S. aureus* clínicas no se observaron alteraciones en el valor de la CIM de CMP a ninguna concentración de Q utilizadas en la combinación (Figura 8.11):

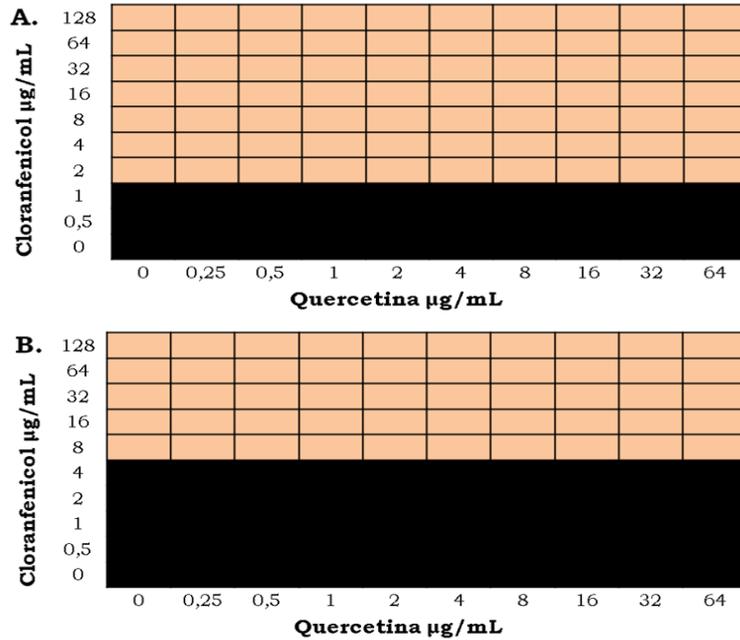


Figura 8.11: Interacción entre CMP+Q frente a: A. *E. coli* clínica. B. *S.aureus* clínica.

Un comportamiento similar se observó en las cepas ATCC de estas bacterias en las cuales Q no modificó el valor de la CIM de CMP (Figura 8.12).

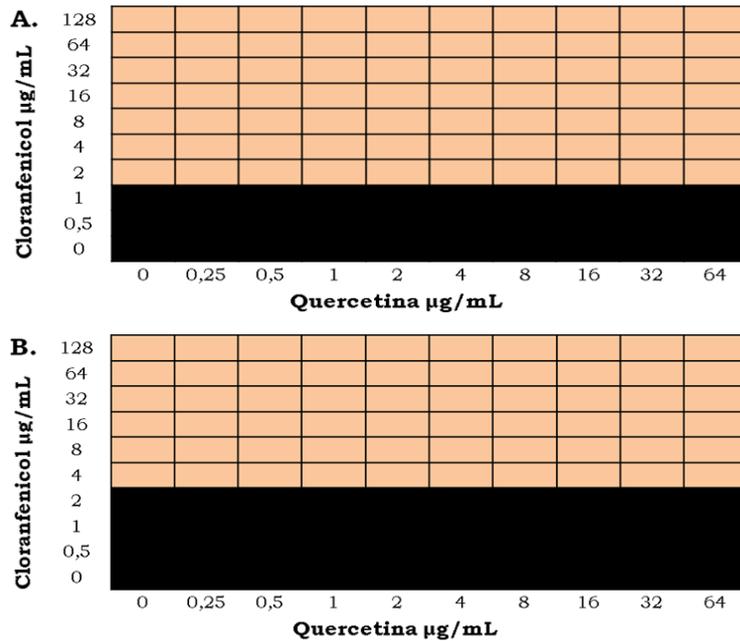


Figura 8.12: Efecto de Q sobre la actividad antibacteriana de CMP frente a: A. *E. coli* ATCC 25922. B. *S.aureus* ATCC 29213.

En cuanto a la interacción de CMP con L, se observa que en la cepa clínica de *E. coli* no ocurren cambios en el valor de la CIM de CMP en presencia de L, sin embargo, en la cepa clínica de *S. aureus* se manifiesta un aumento en la sensibilidad

bacteriana frente a CMP ya que el valor de la CIM de CMP disminuye en 1 factor de dilución a 32 $\mu\text{g/mL}$ de L, y en 3 diluciones respecto a su CIM individual a 125 $\mu\text{g/mL}$ del flavonoide, cambiando este valor 4 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8.13).

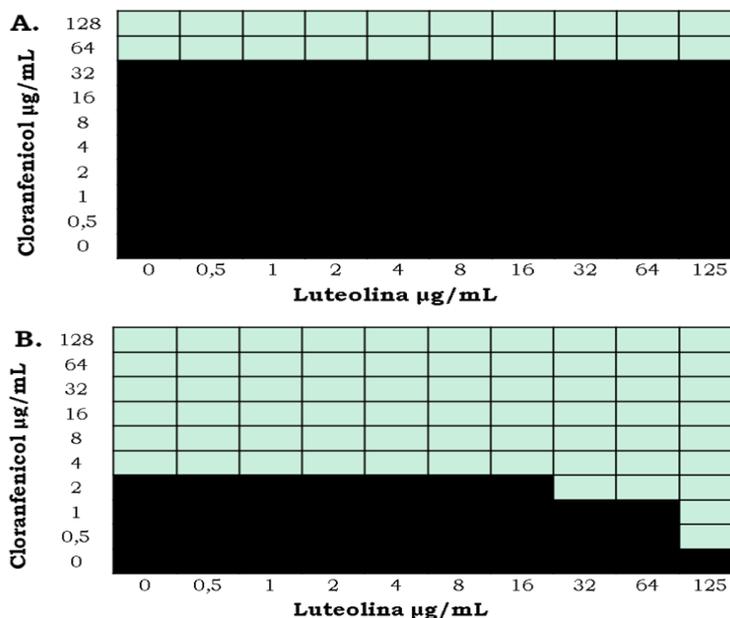


Figura 8.13: Interacción entre CMP+L frente a: A. *E. coli* clínica. B. *S. aureus* clínica.

Nuevamente no es posible llevar a cabo el cálculo del índice ICIF para la combinación CMP+L en las cepas clínicas de *E. coli* y *S. aureus*, dado la imposibilidad de obtener el valor de la CIM individual del flavonoide, el cual carece de actividad antibacteriana en dichas cepas.

En lo referente a la evaluación del efecto de la interacción de L y CMP frente a las cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*, se observa que para el caso de *E. coli*, la presencia de L a concentraciones entre 0,5 y 2 $\mu\text{g/mL}$ provoca una disminución de la sensibilidad bacteriana, dado que el valor de la CIM de CMP aumenta 1 dilución respecto a la CIM individual, mientras que a 64 $\mu\text{g/mL}$ del flavonoide se observa el efecto contrario ya que la sensibilidad bacteriana frente a CMP aumenta, reflejado en una disminución en 1 factor de dilución del valor de la CIM de dicho antibiótico. Si bien ocurren ciertas alteraciones en el valor de la CIM de CMP, las mismas no se consideran, dado que sólo son modificaciones en un factor de dilución. Por último, en la cepa de *S. aureus* ATCC se observa que la presencia de L a 16 $\mu\text{g/mL}$ origina un aumento en la susceptibilidad bacteriana disminuyendo el valor de la CIM de CMP 4 veces respecto a su CIM individual, mientras que a 64 $\mu\text{g/mL}$ del flavonoide, ocurre una disminución de 8 veces del valor de la CIM de CMP respecto a su CIM individual (Figura 8.14)

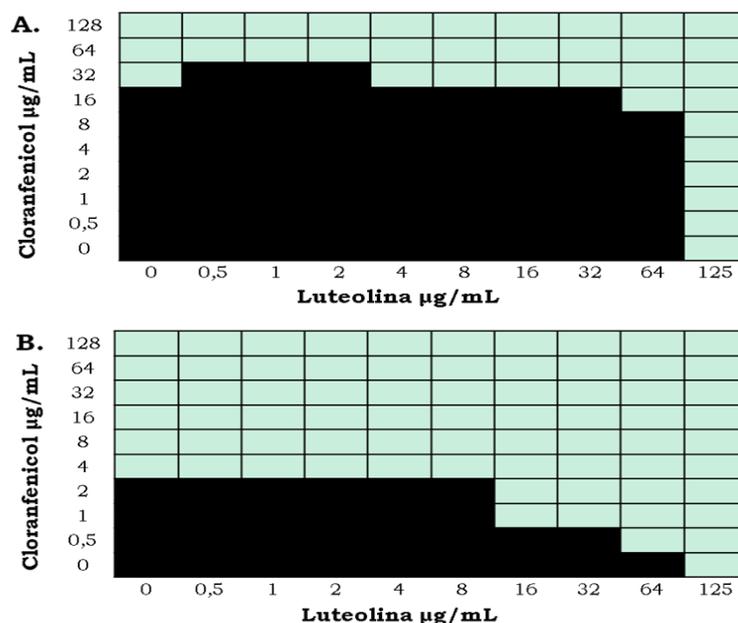


Figura 8.14: Efecto de L sobre la actividad antibacteriana de CMP frente a: A. *E. coli* ATCC 25922. B. *S. aureus* ATCC 29213.

Al llevar a cabo el cálculo de los valores de ICIF para las cepas ATCC en las cuales se obtuvieron los valores de la CIM individual del antibiótico y del flavonoide, se observó que en la cepa de *E. coli* ATCC, ocurre una interacción de tipo **indiferente** para la combinación de CMP+L, obteniéndose valores de ICIF superiores a 1, lo cual se condice con la consideración dentro del error experimental a las alteraciones en solo 1 factor de dilución. Para el caso de la cepa de *S. aureus* ATCC se observa **aditivismo** (ICIF=0,625) para la combinación CMP+L cuando la CIM del antibiótico se redujo 8 veces respecto de su CIM individual (pasó de 4 a 0,5 µg/mL) a una concentración de 64 µg/mL de L, y nuevamente un efecto **sinérgico**, al igual que en los ensayos con GEN y CIP, para dicha combinación (ICIF=0,378) al disminuir 4 veces el valor de la CIM de CMP (cambió de 4 a 1 µg/mL) y 8 veces el valor de la CIM del flavonoide (cambió de 125 a 16 µg/mL) respecto a sus valores de CIM individuales. Es decir que a una concentración de 16 µg/mL de L la actividad antibacteriana de CMP se incrementaría sustancialmente frente a *S. aureus* ATCC (Tabla 8.6).

Tabla 8.6: Concentración Inhibitoria Mínima, Concentración Inhibitoria Fraccional e Índice CIF en la combinación de L y CMP en cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*.

<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>S. aureus</i> ATCC 29213		
CMP (CIM=32)			CMP (CIM=4)		
CIM _{CMP}	CIF _{CMP}	ICIF _{CMP+L}	CIM _{CMP}	CIF _{CMP}	ICIF _{CMP+L}
64	0,5	1,5	1	0,25	0,378
16	0,5	1	0,5	0,125	0,625

CIM_{CMP}= CIM de cloranfenicol en presencia de luteolina. *CIF_{CMP}*= CIF de cloranfenicol en presencia de luteolina. *ICIF_{CMP+L}*= ICIF de la combinación.

Por lo tanto, se puede inferir que Q no alteraría a actividad antibacteriana de CMP frente a las cepas ATCC y clínicas de *E. coli* y *S. aureus*. Mientras que si bien la presencia de L no modificaría la actividad antibacteriana de CMP en las cepas ATCC y clínicas de *E. coli*, en las cepas de *S. aureus* se observa un efecto beneficioso dado que en *S. aureus* clínica se manifiesta un aumento en la sensibilidad bacteriana frente a dicho antibiótico en presencia del flavonoide, y en *S. aureus* ATCC ocurre un efecto aditivo y sinérgico entre CMP y L, permitiendo potenciar la actividad antibacteriana de CMP.

La combinación de CMP y Q ya fue reportada con anterioridad en una cepa clínica de *E. coli* sensible a CMP manifestando que dicho flavonoide no altera la actividad antibacteriana de dicho antibiótico (Smirnova y col., 2012), sin embargo, no existen estudios donde se evalúe el efecto de esta combinación en cepas de *E. coli* ATCC ni en cepas de *S. aureus*. En cuanto a la combinación CMP y L, no se han llevado a cabo hasta el momento estudios en cuanto al efecto de dicha combinación en cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Por lo cual los resultados obtenidos son un interesante aporte dado que confirman datos obtenidos previamente y contribuyen con nuevos datos en cuanto al estudio de la combinación de estos flavonoides con CMP.

Para finalizar, analizando globalmente los resultados obtenidos sobre el efecto de Q y L, tanto en producción de ERO inducida por CMP, como en actividad antibacteriana del mismo se puede afirmar que, al igual que lo ocurrido con CIP, Q y L manifestaron una importante actividad inhibitoria de la producción de ERO inducidas por CMP sin alterar la actividad antibacteriana del mismo en la mayoría de los casos y beneficiando a dicha actividad para el caso de L, la cual es capaz de potenciar la actividad antibacteriana de éste fármaco frente a las distintas cepas de *S. aureus* evaluadas, manifestado tanto efectos de **aditivismo** como **sinergismo**.

8.5. Conclusiones Parciales

Los resultados obtenidos demostraron que el potente efecto protector manifestado por Q y L frente al estrés oxidativo inducido por GEN a nivel sistémico, puede extenderse a otros antibióticos capaces de inducir estrés oxidativo en células sanguíneas como CIP y CMP.

En el caso de CIP, ambos flavonoides demostraron una importante actividad inhibitoria de las ERO inducidas por este antibiótico, siendo Q el mas potente y manifestando ambos mayor actividad que el inhibidor de referencia. La determinación del valor de CI₅₀ a una concentración de CIP de 16 µg/mL, es decir, 32 veces mayor a las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración de dosis terapéuticas (0,5 µg/mL), es un dato importante ya que aún incrementando las dosis terapéuticas de CIP se podría contrarrestar la producción de ERO a nivel sistémico al combinarla con Q o L.

En lo referente a CMP, nuevamente Q y L demostraron un potente efecto inhibitorio de las ERO inducidas por CMP sobrepasando el efecto del inhibidor de referencia, y en este caso, a diferencia de lo observado para CIP, ambos flavonoides demostraron un efecto protector similar. La determinación del valor de CI_{50} en este caso se realizó a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentración plasmática a dosis terapéuticas) dada la toxicidad a nivel sanguíneo que presenta este antibiótico, por lo cual si bien no se evaluaron concentraciones mayores que permitan aumentar la dosis de dicho antibiótico, estos resultados darían un indicio de la posibilidad de disminuir los efectos tóxicos de este potente antimicrobiano a dosis terapéuticas, hecho que permitiría dar un paso hacia su reutilización generalizada en la clínica médica.

La determinación del efecto de Q y L sobre la actividad antibacteriana de CIP y CMP, frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*, proporcionó muy buenos resultados. En la mayoría de los casos la presencia de estos flavonoides no alterarían la actividad antibacteriana de CIP y CMP, lo cual es un dato muy beneficioso, y si bien se advirtió un efecto desfavorable sobre la actividad antibacteriana de CIP frente a la cepa clínica de *S. aureus* al combinarlo con Q, se observaron efectos de adición y sinergismo al combinar tanto CIP como CMP con L, lo cual superó gratamente todas las expectativas.

Estos resultados son una importante contribución al estudio de la combinación de flavonoides y estos antibióticos, no solo abordando el efecto sobre células sanguíneas del huésped, de los cuales no existían hasta el momento reportes al respecto, sino que también observando el efecto de la combinación de los mismos sobre las células bacterianas, siendo esto último un interesante aporte de datos que se oponen o confirman reportes previos, como una importante contribución de nuevos informes en cuanto al estudio de la combinación de estos flavonoides con CIP y CMP en *E. coli* y *S. aureus*.

8.6. Bibliografía

- Abreu, A.C., Serra, S.C., Borges, A., Saavedra, M.J., Mcbain, A.J., Salgado, A.J., Simões, M., 2015. Combinatorial Activity of Flavonoids with Antibiotics Against Drug-Resistant Staphylococcus aureus. *Microb. Drug Resist.* 21 (6), 600–609.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2016. Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS. Recuperado el 29 de Diciembre de 2016 de <https://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar>.
- Aiassa, V., Zoppi, A., Becerra, M.C., Albesa, I., Longhi, M.R., 2016. Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol: β -cyclodextrin:N-acetylcysteine complex. *Carbohydr. Polym.* 152, 672–678.
- Albesa, I., Becerra, M.C., Battán, P.C., Páez, P.L., 2004. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2), 605–609.

- Albrecht, C., Pellarin, G., Rojas, M.J., Albesa, I., Eraso, A.F., 2010. Beneficial effect of *Berberis buxifolia* Lam, *Ziziphus mistol* Griseb and *Prosopis alba* extracts on oxidative stress induced by chloramphenicol. *Medicina* (B Aires). 70 (1), 65–70.
- Becerra, M.C., Albesa, I., 2002. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (4), 1003–1007.
- Becerra, M.C., Eraso, A.J., Albesa I., 2003. Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdine in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. *Lumin.* 18 (6), 334–340.
- Becerra, M.C., Páez, P.L., Laróvere, L.E., Albesa, I., 2006. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Mol. Cell. Biochem.* 285 (1–2), 29–34.
- Correa Salde, V., Albesa, I., 2009. Reactive oxidant species and oxidation of protein and hemoglobin as biomarkers of susceptibility to stress caused by chloramphenicol. *Biomed. Pharmacother.* 63 (2), 100–104.
- Elbe, H., Dogan, Z., Taslidere, E., Cetin, A., Turkoz, Y., 2016. Beneficial effects of quercetin on renal injury and oxidative stress caused by ciprofloxacin in rats: A histological and biochemical study. *Hum. Exp. Toxicol.* 35 (3), 276–281.
- Eraso, A.J., Albesa, I., 2007. *Eriobotrya japonica* counteracts reactive oxygen species and nitric oxide stimulated by chloramphenicol. *Am. J. Chin. Med.* 35 (5), 875–885.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive Document E. Def 1.2. *Clin. Microbiol. Infect.* 6 (9), 503–508.
- Farombi, E.O., Adaramoye, O.A., Emerole, G.O., 2002. Influence of chloramphenicol on rat hepatic microsomal components and biomarkers of oxidative stress: Protective role of antioxidants. *Pharmacol. Toxicol.* 91 (3), 129–134.
- Gürbay, A., Gonthier, B., Barret, L., Favier, A., Hincal, F., 2007. Cytotoxic effect of ciprofloxacin in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. *Toxicology.* 229 (1–2), 54–61.
- Hincal, F., Gürbay, A., Favier, A., 2003. Biphasic response of ciprofloxacin in human fibroblast cell cultures. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 1 (4), 481–492.
- Holt, D.E., Ryder, T.A., Fairbairn, A., Hurley, R., Harvey, D., 1997. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: I. In vitro effects on cells in culture. *Hum. Exp. Toxicol.* 16 (10), 570–576.
- Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.R., Rex, J.H., 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (3), 693–715.
- Mendoza Patiño, N., 2008. Farmacología Médica. Editorial Médica Panamericana: México.
- Organización Mundial de la Salud, 2004. Formulario Modelo de la OMS 2004. (2ª Edición). Recuperado el 30 de Diciembre de 2016 de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/10.2.2.html>
- Páez, P.L., Bazán, C.M., Bongiovanni, M.E., Toneatto, J., Albesa, I., Becerra, M.C., Argüello, G.A., 2013. Oxidative stress and antimicrobial activity of chromium(III)

- and ruthenium(II) complexes on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biomed. Res. Int.* 2013, 906912.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I., 2008. Chloramphenicol-Induced Oxidative Stress in Human Neutrophils. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103 (4), 349–353.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I., 2010b. Antioxidative mechanism protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24 (6), 771–776.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I., 2011. Comparison of macromolecular oxidation by reactive oxygen species in three bacterial genera exposed to different antibiotics. *Cell. Biochem Biophys.* 61 (3), 467–472.
- Popadic, S., Popadic, D., Ramic, Z., Mostarica Stojkovic, M., Trajkovic, V., Milinkovic, M., Medenica, L., 2006. Chloramphenicol induces in vitro growth arrest and apoptosis of human keratinocytes. *Cell Biol Toxicol.* 22 (5), 371–379.
- Qin, P., Liu, R., 2013. Oxidative stress response of two fluoroquinolones with catalase and erythrocytes: a combined molecular and cellular study. *J. Hazard. Mater.* 252–253, 321–329.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 2000. *Farmacología*. (4ª Edición) Harcourt Brace: Madrid.
- Sánchez Navarro, M.D., Coloma Milano, C., Zarzuelo Castañeda, A., Sayalero Marinero, M.L., Sánchez-Navarro, A., 2002. Pharmacokinetics of ciprofloxacin as a tool to optimise dosage schedules in community patients. *Clin. Pharmacokinet.* 41 (14), 1213–1220.
- Saniabadi, A.R., Wada, K., Umemura, K., Sakuma, S., Nakashima, M., 1996. Impairment of phagocytic cell respiratory burst by UVA in the presence of fluoroquinolones: an oxygen-dependent phototoxic damage to cell surface microvilli. *J. Photochem. Photobiol B.* 33 (2), 137–142.
- Shaki, F., Ashari, S., Ahangar, N., 2016. Melatonin can attenuate ciprofloxacin induced nephrotoxicity: Involvement of nitric oxide and TNF- α . *Biomed. Pharmacother.* 84, 1172–1178.
- Smirnova, G., Samoilova, Z., Muzyka, N., Oktyabrsky, O., 2012. Influence of plant polyphenols and medicinal plant extracts on antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 113 (1), 192–199.
- Sweetman, S.C. (Ed.), 2009. Martindale the complete drug reference. Pharmaceutical Press: London.
- Talla, V., Veerareddy, P.R., 2011. Oxidative stress induced by fluoroquinolones on treatment for complicated urinary tract infections in Indian patients. *J. Young Pharm.* 3 (4), 304–309.
- Taslidere, E., Dogan, Z., Elbe, H., Vardi, N., Cetin, A., Turkoz, Y., 2016. Quercetin protection against ciprofloxacin induced liver damage in rats. *Biotech. Histochem.* 91 (2), 116–121.
- Yunis, A.A., Lim, L.O., Arimura, G.K., 1986. DNA damage induced by chloramphenicol and nitroso-chloramphenicol: protection by N-acetylcysteine. *Respiration.* 50, 50–55.

Wagai, N., Tawara, K., 1991. Quinolone antibacterial-agent-induced cutaneous phototoxicity: ear swelling reactions in Balb/c mice. *Toxicol. Lett.* 58 (2), 215-223.



Conclusiones Generales



Conclusiones Generales

El presente trabajo de tesis doctoral estuvo abocado principalmente a la búsqueda de productos naturales, particularmente flavonoides, como potenciales agentes protectores del estrés oxidativo inducido por distintos antibióticos a nivel de circulación sistémica con el fin de lograr nuevas estrategias farmacológicas que permitan mejorar las terapias actuales con antimicrobianos.

Tres antibióticos fueron seleccionados para llevar a cabo estos estudios: CIP, debido a su frecuente uso en la clínica y a la alta tasa de resistencia bacteriana que posee; CMP, antibiótico de bajo costo, potente, de uso extremadamente limitado debido a su alta toxicidad y GEN, antibiótico de uso limitado dado sus importantes efectos secundarios y el cual, a diferencia de los anteriores, no poseía estudios realizados sobre sus efectos en el estatus redox de leucocitos humanos.

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de GEN en leucocitos humanos MN y PMN permitieron brindar importante información sobre el efecto diferencial que este antibiótico genera en dichas células, manifestándose un significativo incremento en la producción de ERO dependiente de la concentración del antibiótico, alteración de las defensas antioxidantes endógenas (SOD y CAT) revelando un efecto bifásico en las células MN, y aumento de peroxidación lipídica en ambos tipos celulares, siendo superior la inducción de estrés oxidativo en las células PMN.

Seis flavonoides de variada naturaleza química fueron aislados de especies vegetales autóctonas pertenecientes a los géneros *Flaveria* y *Prosopis*, los mismos fueron: un flavonol aglicón (**Quercetina**) y dos de sus derivados sulfatados (**ATS** y **QTS**), una flavona aglicona (**Luteolina**) y dos flavonas C-glicosiladas las cuales son isómeros de posición (**Vitexina** e **Isovitexina**). Al evaluar el efecto inhibitorio de los mismos sobre la producción de ERO inducidas por GEN en leucocitos MN, el orden creciente de actividad inhibitoria de las ERO generadas por GEN, fue: ATS<QTS<Isovitexina<Vitexina<Luteolina<Quercetina. Estos resultados fueron coherentes con los requerimientos estructurales determinantes para la actividad antioxidante, dado que ATS y QTS son flavonoides cuyos grupos OH están totalmente sustituidos, vitexina e isovitexina son flavonoides glicosilados y por último quercetina y luteolina, son los únicos flavonoides aglicones del grupo los cuales fueron los más activos e incluso con mayor actividad inhibitoria que el inhibidor de referencia, vitamina C, en leucocitos MN y de similar actividad respecto a este inhibidor en células PMN, siendo en ambos casos superior la actividad de quercetina respecto a luteolina, por lo cual, éstos flavonoides se seleccionaron para continuar con los estudios. Al evaluar el efecto de los mismos sobre la actividad SOD y CAT alterada por GEN en ambos tipos de leucocitos, se advirtió que tanto luteolina como quercetina, ante el estímulo de ERO inducido por GEN, tienden a restaurar los valores basales de la actividad de ambas enzimas, efecto que estaría dado tanto por su poder de captación de ERO como por la capacidad intrínseca que poseen ambos

flavonoides de aumentar la actividad de dichas enzimas antioxidantes a altas concentraciones, con lo cual ambos flavonoides cooperarían con la actividad de dichas defensas antioxidantes endógenas permitiendo la recuperación de la actividad de estas enzimas en presencia del antibiótico. Y por último en cuanto a su efecto sobre la peroxidación lipídica inducida por GEN, se observó que ambos flavonoides serían capaces de evitar la peroxidación de lípidos incrementada por este antibiótico, siendo la actividad de quercetina levemente superior a luteolina.

En cuanto a los estudios *in vivo* en ratas Wistar tratadas conjuntamente con dosis terapéuticas de GEN y ambos flavonoides (llevados a cabo con el fin de confirmar el efecto protector a nivel sistémico observado *in vitro*), se pudo determinar que GEN a dosis terapéuticas es capaz de inducir **Estrés Oxidativo Crónico** a nivel sistémico, en el cual se observa un incremento del nivel de ERO prolongado en el tiempo, incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas como una respuesta para contrarrestar las ERO generadas, y dado que la actividad de las enzimas se ve excedida por el aumento de dichas ERO, consecuentemente se observa un incremento de la peroxidación lipídica. Sin embargo, el tratamiento conjunto del antibiótico con ambos flavonoides demostró que ellos son capaces de disminuir el estrés oxidativo generado por este antibiótico a nivel sistémico, restablecer la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) a sus niveles basales y reducir de la peroxidación lipídica.

Para la evaluación del efecto que la actividad protectora del estrés oxidativo sobre células sanguíneas manifestada por ambos flavonoides pudiera tener sobre la actividad antibacteriana de GEN, se llevaron a cabo ensayos sobre cepas sensibles y resistentes a GEN de *E. coli* y *S. aureus*. Si bien la combinación de estos flavonoides no alteraría la actividad antibacteriana de GEN en la mayoría de los casos, al combinar quercetina con GEN en las cepas de *S. aureus*, tanto sensible como resistente, se generarían efectos beneficiosos sobre su actividad antibacteriana, dado que la presencia del flavonoide disminuye el valor de la CIM del antibiótico en dichas bacterias. Por otro lado, la combinación de luteolina y GEN manifestó un interesante efecto **aditivo** y **sinérgico** en las cepas de referencia (ATCC) tanto de *E. coli* como de *S. aureus*, lo cual superó gratamente las expectativas.

Por último, con el fin de llevar a cabo estudios que nos permita determinar si el significativo efecto protector de las células del huésped contra el estrés oxidativo inducido por GEN puede extenderse a otros antibióticos, tales como CIP y CMP, de los cuales se conoce que son capaces de inducir estrés oxidativo en leucocitos, eritrocitos y sangre entera, se evaluó el efecto de los flavonoides quercetina y luteolina sobre la producción de ERO inducido por estos antibióticos en leucocitos humanos y sobre la actividad antibacteriana de los mismos. Así, se pudo demostrar que ambos flavonoides poseen importante actividad inhibitoria de la producción de ERO inducida por CIP y por CMP, siendo el efecto de quercetina mayor al de luteolina sólo para el caso de CIP y siendo en ambos casos más potentes que el inhibidor de

referencia. En cuanto al efecto sobre la actividad antibacteriana, dichos flavonoides no alterarían la actividad antibacteriana de CIP y CMP, a excepción de un efecto desfavorable en la cepa clínica de *S. aureus* provocado al combinar Q+CIP, y un efecto potenciador de dicha actividad al combinar ambos antibióticos con luteolina frente a las cepas de *S. aureus*, con efectos **aditivos** y **sinérgicos** en la cepa ATCC, lo cual superó gratamente las expectativas.

De modo que, se pudo demostrar que GEN es un antibiótico capaz de inducir estrés oxidativo en leucocitos humanos in vitro y en sangre entera de ratas tratadas con dosis terapéuticas del mismo in vivo.

Del grupo de seis flavonoides evaluados, los aglicones quercetina y luteolina fueron los más activos lo cual se condice con los requerimientos estructurales necesarios para la actividad antioxidante.

*Tanto quercetina con luteolina demostraron un marcado efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por GEN en leucocitos humanos in vitro, y en sangre entera in vivo disminuyendo el estrés oxidativo y cooperando en el restablecimiento del balance redox, sin modificar sustancialmente la actividad antibacteriana de dicho fármaco en la mayoría de los casos y contribuyendo a dicha actividad en las cepas de *S. aureus* para la combinación con quercetina, y en las cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus* para la combinación de luteolina la cual manifestó efectos aditivos y sinérgicos.*

El efecto protector demostrado por quercetina y luteolina sobre las células sanguíneas puede extenderse a antibióticos como CIP y CMP manifestándose un importante efecto inhibitorio sobre el estrés oxidativo inducido por éstos a nivel sistémico sin alterar, e incluso potenciando la actividad antibacteriana de los mismos lo cual permitiría avanzar hacia las mejoras las terapias con CIP y la reutilización clínica de un potente antibiótico como es CMP.

*Por lo tanto, la administración simultánea de los flavonoides **quercetina** ó **luteolina** con GEN podría representar una potencial opción terapéutica ya que demuestran un marcado efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por dicho antibiótico en sangre periférica, lo cual permitiría evitar las consecuencias clínicas causadas por la producción de especies reactivas y radicales libres sin alterar ó incluso incrementando la actividad antibacteriana del mismo, pudiendo además extenderse dichos efectos beneficiosos en el mejoramiento de las terapias antimicrobianas con CIP y CMP.*

Proyecciones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral permiten abrir interesantes líneas de investigación las cuales pueden estar orientadas por un lado hacia la evaluación más detallada de los mecanismos involucrados en el efecto protector de los flavonoides, y por el otro, hacia el avance en estudios que permitan alcanzar una estrategia farmacológica viable en la práctica clínica.

La investigación de los mecanismos involucrados en el efecto protector de los flavonoides tales como la determinación del tipo específico de ERO que se generan en las células tras ser expuestas al sistema antibiótico-flavonoide, como también la participación de las ERN en el estrés oxidativo inducido por antibióticos y el efecto que los flavonoides pudieran tener sobre estas especies, permitirían una mayor comprensión de los fenómenos involucrados en el efecto protector.

En este sentido también resulta de importancia la profundización del conocimiento del efecto de los flavonoides activos sobre las enzimas antioxidantes endógenas y biomarcadores de estrés oxidativo, avanzando en la determinación no solo de peroxidación lipídica sino evaluando otros biomarcadores como oxidación de proteínas y oxidación del ADN alterados por los antibióticos CIP y CMP, con el fin de complementar los estudios con dichos antibióticos.

La posibilidad de avanzar hacia una estrategia farmacológica viable involucraría la evaluación de un modelo de infección *in vivo* que permita estudiar el sistema completo, con el fin de obtener mayor información sobre el efecto global tanto a nivel de células del huésped como sobre células bacterianas, simultáneamente, tras la administración conjunta de antibióticos y flavonoides, así como el avance hacia estudios que posibiliten una formulación farmacéutica conjunta de antibióticos y flavonoides factible de ser usada en la práctica clínica.

Finalmente, la investigación de los flavonoides como protectores del estrés oxidativo inducido por otro tipo de fármacos, así como el rol que puedan tener sobre otras patologías que impliquen un desbalance redox, permitiría una gran contribución hacia nuevas terapias con productos naturales que beneficien y protejan al ser humano de las consecuencias nocivas causadas por el estrés oxidativo.

Publicaciones Científicas

Durante la presente tesis doctoral se publicó el siguiente trabajo científico:

- **Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016; 48: 253-264. Bustos, PS, Deza-Ponzio R, Páez PL, Albasa I, Cabrera JL, Virgolini MB, OrtegaMG.

APÉNDICE I: Soluciones buffer y medios de cultivo

☞ Solución salina balanceada de Hanks (HBSS)

Composición (g/L)

NaCl	8,0
KCl	0,4
Na ₂ HPO ₄	0,15
KH ₂ PO ₄	0,06
MgSO ₄	0,1
CaCl ₂	0,14
MgCl ₂	0,1
Dextrosa	1,0
NaHCO ₃	0,35

Agua destilada c.s.p.

pH 7,0 ± 0,2

Conservar a 4°C.

☞ Solución de Dextrán 6%

Composición (g/100 mL)

Dextrán 6,0

Buffer Hanks c.s.p.

pH 7,0 ± 0,2

Conservar a 4°C.

☞ Buffer salino de fosfato (PBS)

Composición (g/L)

NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,15
KH ₂ PO ₄	0,2

Agua destilada c.s.p.

pH 7,0 ± 0,2

Conservar a 4°C.

☞ Agar Tripteína Soya (ATS)–Britania

Composición (g/L)

Tripteína	15,0
Peptona de soya	5,0
D (+) glucosa	1,0
NaCl	5,5
Agar–agar (ausente en el caldo)	2,5
Agua destilada c.s.p.	
pH 7,3 ± 0,2	

Disolver 40 g de polvo deshidratado por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 ó 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 118–121°C.

☞ Caldo Mueller Hinton (MH)–Britania

Composición (g/L)

Infusión de carne	300,0
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agua destilada c.s.p.	
pH 7,3 ± 0,2	

Suspender 22 g del medio en un litro de agua destilada y dejar embeber durante 10 minutos, agitando periódicamente. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Distribuir en frascos, esterilizar a 121°C por 15 minutos.