

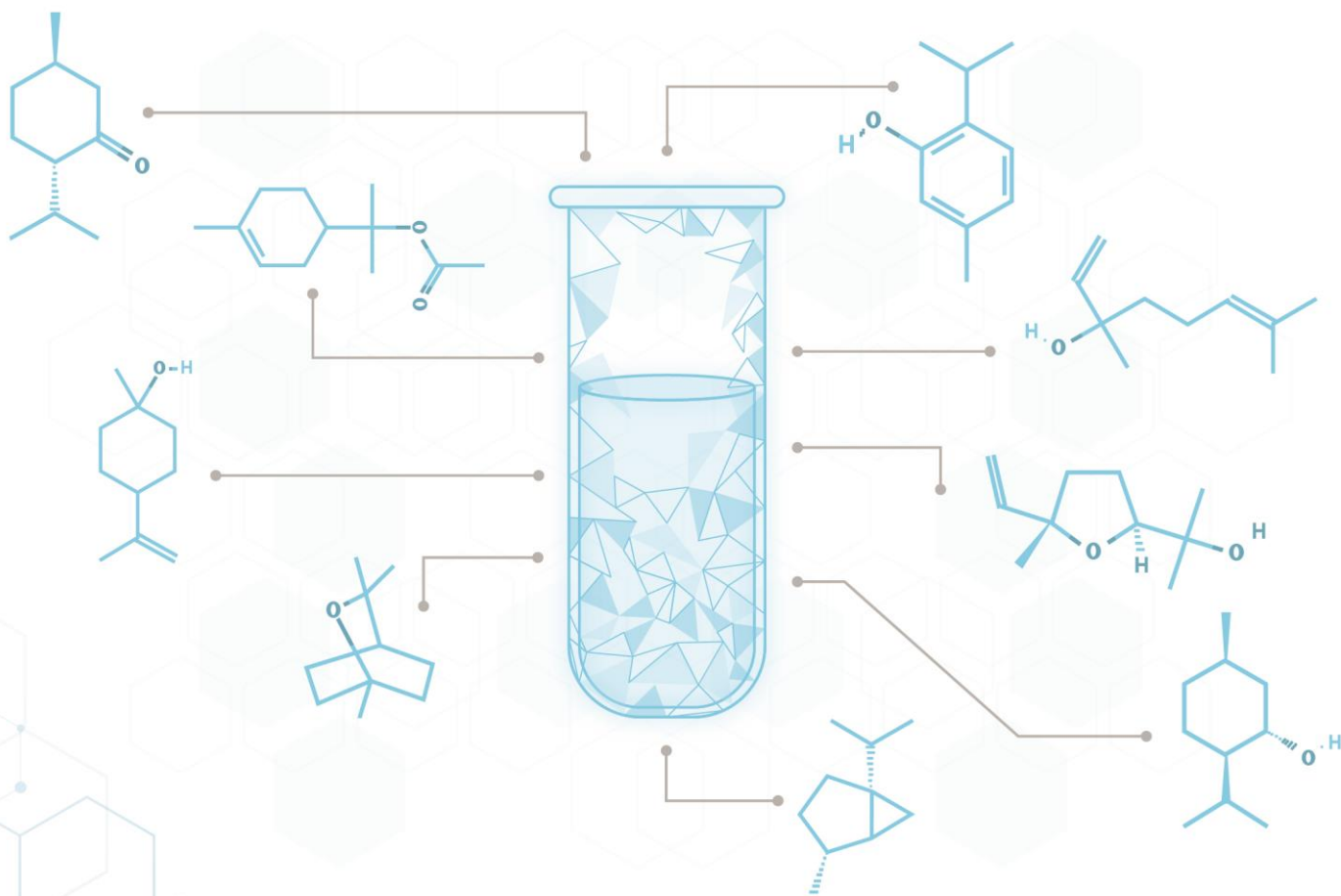


Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Licenciatura en BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis bioquímicos y celulares
del efecto de aceites esenciales de plantas regionales
sobre los depósitos lipídicos en células espumosas y la oxidación de LDL,
que promueven la formación de placas ateroscleróticas.**



Alumna **Bárbara Dumrauf**

Directora **Dra. Rosana Crespo**

Codirectora **Dra. Agustina Castro**

2021 | La Plata

El presente trabajo final de la carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP).



Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata
“Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner”

Agradecimientos

-A mis padres, por ofrecerme la oportunidad de estudiar lo que quería, con los sacrificios que eso conlleva y hacerme saber que nunca lo consideraron un sacrificio. Por ayudarme en cada situación, por escucharme y por siempre permitirme aprender a mi ritmo. A ellos les dedico este título, porque sin ellos no habría podido conseguirlo.

-A mi hermano, por ser amigo además de hermano. Por estar siempre con sus chistes, canciones, videos y sobretodo, cerveza.

-A mi familia, siempre pendiente de mis parciales, finales y trabajo. Acompañando en cada momento.

-A mis directoras Ro y Agus, por guiarme en todo este camino. Por tenerme paciencia infinita, por dedicarme su tiempo y por enseñarme a prestarle atención a los detalles.

-Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP) por permitirme formarme en sus laboratorios.

-A mis amigos. Los que están en Bahía, Cin, Cris, Lulu, Cami, Pris, Juli y Bel, por hacerse siempre tiempo para verme cuando voy, por venir a visitar, por aceptar mis tiempos y siempre tenerme en cuenta por más de la distancia. A Bel y Car que me acompañan desde el primer año en La Plata, con noches de cerveza y chusmerío, consejos y ánimos. A Maca, que me acompañó en este cambio de vida y que siempre estuvo presente. A Juli y Maca, amigas que me dejó esta carrera, por cursadas juntas, mates, chusmerío, aconsejarme e impulsarme en días complicados. A todos ellos, gracias.

-A Asher.

Índice

	Página
1. Introducción	6
1.1 Aterosclerosis	7
1.2 Estrés oxidativo y aterosclerosis	9
1.3 Lípidos de reserva y aterosclerosis	10
1.4 Tratamientos de aterosclerosis	13
1.5 Aceites esenciales y aterosclerosis	13
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo general	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Materiales y métodos	19
3.1 Reactivos	20
3.2 Aceites esenciales	20
3.3 Línea celular THP-1	20
3.3.1 Construcción del modelo de células espumosas	21
3.3.2 Tratamiento de las células	21
3.4 Obtención y oxidación de LDL	21
3.5 Recuento celular	22
3.6 Ensayo de viabilidad celular (Ensayo de MTT)	23
3.7 Separación de lípidos por cromatografía en capa fina (TLC)	24
3.8 Cuantificación de proteínas	27
3.8.1 Ensayo de Lowry	27
3.8.2 Ensayo de Bradford	27
3.9 Análisis del efecto antioxidante por evaluación de peroxidación lipídica (Ensayo de TBARS)	28
3.10 Tinción celular con Oil Red O	29
3.11 Análisis de aceites esenciales por cromatografía gaseosa capilar-espectrometría de masas	29
3.12 Análisis estadístico	30
4. Resultados	31
4.1 Transformación de macrófagos a células espumosas	32
4.2 Efecto de aceites esenciales sobre la viabilidad celular	33
4.3 Efecto de los aceites esenciales sobre los niveles de colesterol en células espumosas	35
4.4 Efecto de los aceites esenciales sobre los niveles de triacilglicéridos en células espumosas	37
4.5 Efecto de los aceites esenciales sobre el contenido lipídico	38
4.6 Efecto de los aceites esenciales sobre la peroxidación lipídica en LDL nativa	39
4.7 Caracterización de los aceites esenciales	40
4.8 Análisis de regresión de los mínimos cuadrados parciales (PLS)	44
5. Discusión	48
6. Conclusiones	54

7. Bibliografía	56
8. Anexo	61

The background of the slide is a repeating pattern of various chemical structures. These include alkenes, alcohols, ketones, and complex polycyclic systems. Many of the structures feature red oxygen atoms and black hydrogen atoms, highlighting specific functional groups or stereochemical features. The structures are scattered across the page, creating a dense, scientific aesthetic.

INTRODUCCIÓN

1.1 Aterosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son una problemática universal en la sociedad moderna. Según el Ministerio de Salud de La Nación, en Argentina anualmente fallecen más de 70.000 personas por ECVs, siendo hasta el año 2019, la primera causa de muertes en el país, seguida por el cáncer (Estadísticas de mortalidad, Argentina) (Figura 1.1).

CAPITULOS	TOTAL	%	REG. CENTRO	REG. CUYO	REG. NEA	REG. NOA	REG. SUR
Cardiovasculares	97219	28,5	30,0	29,4	25,0	22,2	22,8
Tumores	65488	19,2	19,3	19,8	18,6	16,0	23,6
Respiratorias	64869	19,0	20,1	16,1	15,3	17,5	15,6
Lesiones	19419	5,7	4,8	6,7	8,1	7,9	7,3
Infecciosas	14495	4,2	4,2	2,6	3,5	6,8	3,1
DBT	8893	2,6	2,1	4,5	4,4	2,7	4,1
Perinatales	3388	1,0	0,8	1,1	1,8	1,7	1,2
Malformaciones	2365	0,7	0,6	0,9	1,2	0,9	0,8
Mentales	2286	0,7	0,5	1,7	0,6	0,9	1,0
Desnutrición	873	0,3	0,2	0,4	0,3	0,8	0,3
Maternas	246	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Otras definidas	41603	12,2	11,6	13,3	11,8	15,3	14,1
Mal definidas	20544	6,0	5,7	3,6	9,3	7,2	6,0
Total general	341,688	100,0	240,905	25,102	26,155	32,251	16,217

Fuente: elaborado por el SIVER-Ca en base a los registros de mortalidad de la DEIS, Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (INC), Argentina 2019.

Figura 1.1: Importancia relativa de las defunciones registradas en el país y sus regiones geográficas.

La aterosclerosis es la principal causa de ECV que resulta en una alta tasa de mortalidad en la población y algunos de los cuadros clínicos producidos por esta patología son el infarto de miocardio y los accidentes cerebrovasculares (Torres et al., 2015). Se desconocen las causas exactas y los factores de riesgo de la aterosclerosis; sin embargo, ciertas condiciones, rasgos o hábitos pueden aumentar la posibilidad de desarrollar esta enfermedad. La mayoría de los factores de riesgo, incluidos colesterol plasmático elevado, hipertensión, tabaquismo, diabetes mellitus, obesidad y el estilo de vida sedentario, pueden controlarse y la aterosclerosis puede retrasarse o prevenirse (Lu & Daugherty, 2015).

La aterosclerosis se desarrolla por la formación de una placa de ateroma dentro de la pared de la arteria (Figura 1.2) que resulta en la constricción de los vasos y falla en el flujo sanguíneo. La aterosclerosis ocurre como resultado de tres procesos fundamentales: la acumulación de células de músculo liso vascular y leucocitos en la capa íntima endotelial, la secreción de grandes cantidades de matriz de tejido conectivo como fibras de colágeno, proteoglicano y elastina, y la acumulación de ésteres de colesterol (EC) y colesterol libre dentro de las células espumosas (Khosravi et al., 2019).

La activación del endotelio, producida por un estado de estrés oxidativo del organismo, involucra el reclutamiento de células inflamatorias y la deposición constante de lípidos en la capa íntima de la arteria. Además, la activación del endotelio aumenta la permeabilidad de la capa media de la pared arterial, aumentando la retención de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés, *low density lipoproteins*). Las LDL (principales portadoras de colesterol a los tejidos periféricos) se oxidan fácilmente para formar LDL oxidadas (LDLox) debido a sus abundantes lípidos, que contienen ácidos grasos (AG) poliinsaturados en fosfolípidos y EC (Guo et al., 2019).

Los monocitos son atraídos por señales pro-inflamatorias provenientes del endotelio activado y se adhieren a los sitios arteriales afectados (Chistiakov et al., 2016). El ingreso de monocitos al espacio subendotelial de la arteria alienta la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos, el cual promueve la conversión de monocitos en macrófagos.

Los macrófagos expresan en su superficie celular una serie de receptores específicos para LDL oxidada (LDLox) denominados receptores “basurero”. Los fosfolípidos oxidados, principales componentes estructurales de las LDLox, son los ligandos de estos receptores, por lo que el colesterol es internalizado hacia los macrófagos y las enzimas colesterol acil-transferasa convierten el colesterol a EC (Sierra et al., 2015).

La re-esterificación del colesterol determina si los macrófagos se transformarán en células espumosas. Luego de la absorción, las lipoproteínas se transfieren a los lisosomas tardíos donde son hidrolizados los EC, generando colesterol libre. A su vez, el colesterol libre es esterificado *de novo* y almacenado como lípido en el retículo endoplasmático (RE) (Chistiakov et al., 2016). Esto da como resultado la deposición de colesterol libre y esterificado en los macrófagos y la generación de células espumosas (Chistiakov et al., 2017).

La respuesta inflamatoria se agudiza y continúa la formación del núcleo lipídico y el desarrollo de la placa de ateroma (Sierra et al., 2015). Conforme progresa la formación de la misma, las células del músculo liso migran desde la capa media a la íntima donde forman la envoltura fibrosa de la placa, generando un núcleo necrótico a partir de las células espumosas y células del músculo liso que sufren apoptosis (Figura 1.2).

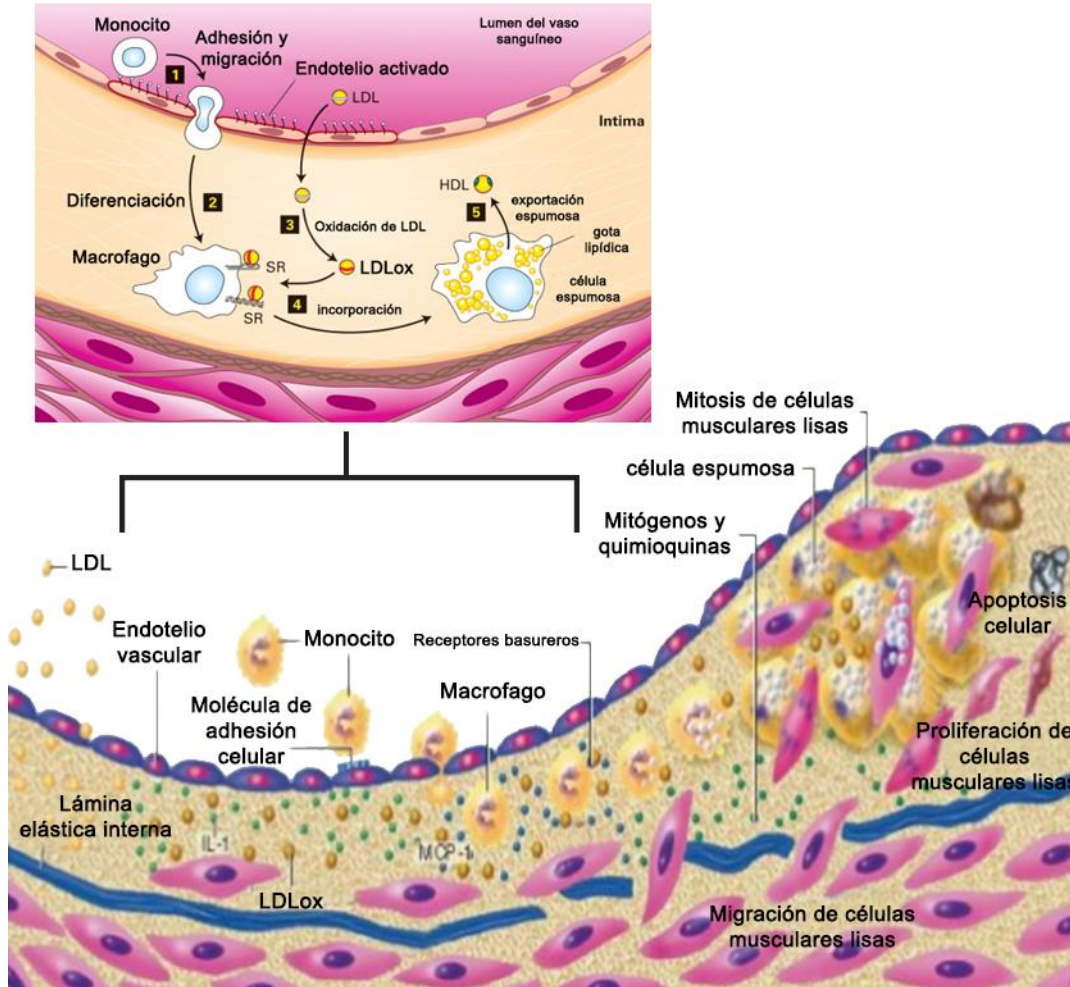


Figura 1.2: Formación de placa de ateroma.

1.2 Estrés oxidativo y aterosclerosis

En los sistemas biológicos, el término "estrés oxidativo" se remonta al período inicial sobre las investigaciones sobre el oxígeno y se definió como una alteración en el equilibrio oxidante y antioxidante (Khosravi et al., 2019).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son un grupo de pequeñas moléculas reactivas que desempeñan un papel fundamental en la regulación de diversas funciones celulares y procesos biológicos. Cuando las EROs se producen en una cantidad excesiva, pueden oxidar lípidos, proteínas y ADN, dañando así muchos componentes celulares e incluso provocando daño genético y muerte celular (Kattoor et al., 2017).

Las células han desarrollado sistemas de defensa mediante enzimas como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, que neutralizan estas especies reactivas (Förstermann et al., 2017).

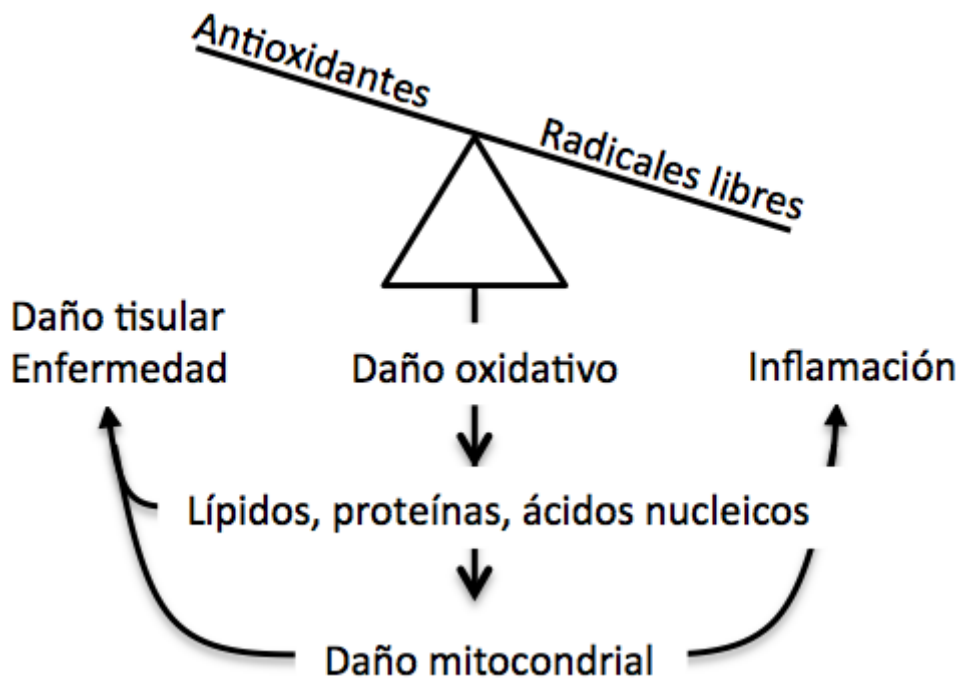


Figura 1.3: Desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y defensas antioxidantes que genera un estado de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es entonces el resultado de un desequilibrio (Figura 1.3) entre la producción y eliminación de EROs (defensas antioxidantes) que puede llegar a desencadenar muerte celular, apoptosis y necrosis (Khosravi et al., 2019).

Por lo tanto, el estrés oxidativo genera EROs capaces de oxidar LDL, las cuales van a ser internalizadas por macrófagos y formar células espumosas, mecanismo clave en el desarrollo de la aterosclerosis (Rosales et al., 2010).

1.3 Lípidos de reserva

El colesterol y los AG son lípidos importantes que componen las membranas de las células animales, precursores de una amplia variedad de moléculas que desempeñan funciones biológicas de gran magnitud.

El colesterol (Figura 1.4) es una molécula indispensable que desempeña funciones estructurales y metabólicas vitales en el ser humano. Se encuentra en la membrana plasmática de cada célula, modulando la fluidez, permeabilidad y funciones de la misma. Es también precursor de otras biomoléculas de gran importancia fisiológica, tales como las hormonas esteroideas, ácidos biliares y la vitamina D (van der Velde, 2010).

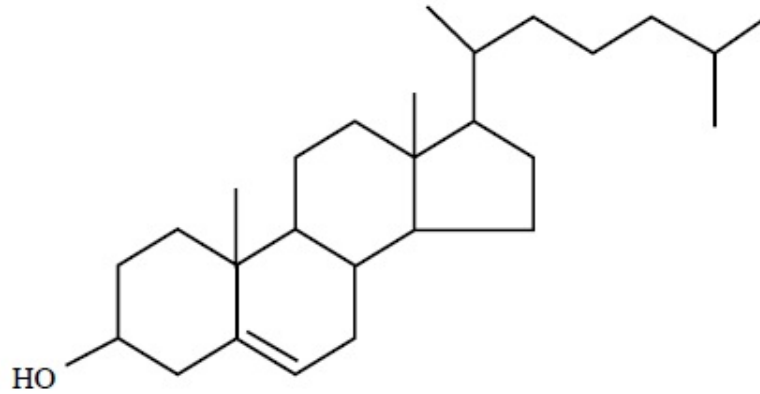


Figura 1.4: Molécula de colesterol.

La regulación de los niveles de colesterol es un proceso complejo que involucra la captación, biosíntesis, transporte, metabolismo y secreción del mismo (Ohashi et al., 2005). La célula puede adquirir colesterol a través de dos vías: biosíntesis *de novo* o en forma exógena a partir de la dieta.

El colesterol, al ser insoluble en medios acuosos como la sangre, es empaquetado en lipoproteínas para su transporte (Figura 1.5) (Campos Aldrete, 2010). Las lipoproteínas son ensamblados macromoleculares de proteínas y lípidos con diferentes densidades según el tamaño y el contenido y clases de proteínas y lípidos que las componen.

En el hígado se producen lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en inglés, *very low density lipoproteins*) que son ricas en triacilglicéridos (TAG) y colesterol. Una vez terminado el proceso de hidrólisis e intercambio de lípidos, las VLDL se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia y luego en LDL (Figura 1.5), altamente enriquecidas en colesterol y EC. Las LDL son captadas por receptores en la superficie celular y se internalizan hacia endosomas/lisosomas tardíos donde los EC se hidrolizan generando colesterol libre y AG (Chen et al., 2019).

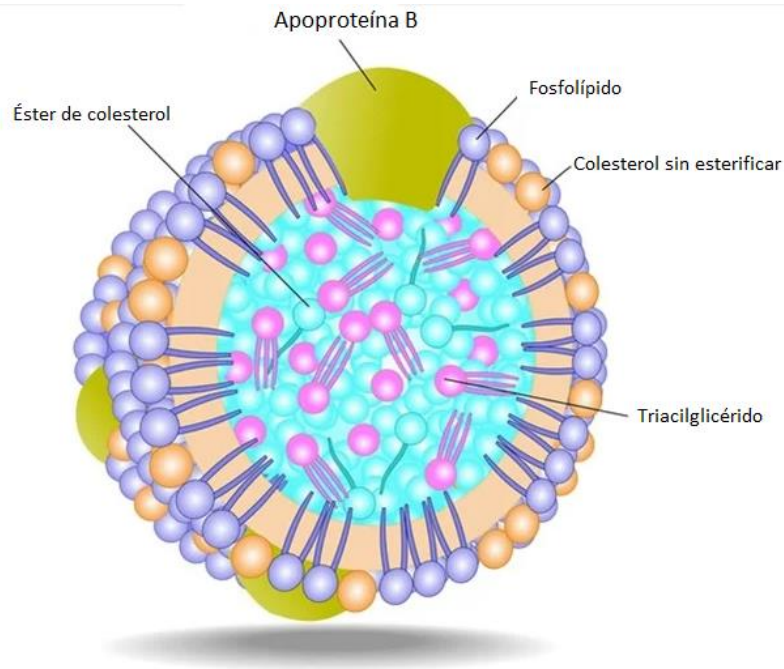


Figura 1.5: Estructura de lipoproteína de baja densidad (LDL).

El almacenamiento de lípidos ocurre a través de un conjunto de reacciones químicas que regulan la conversión intracelular de AG en TAG, la del colesterol en EC y su posterior almacenamiento dentro de las células en forma de gotas lipídicas (GL). La formación de las GL se produce en sitios especializados del RE y la biogénesis de las mismas comprende la acumulación de lípidos no polares (principalmente TAG y EC) en la bicapa del RE (Figura 1.6). Cuando se acumula suficiente TAG y EC dentro de la bicapa del RE, es que se produce la formación de la gota (Bianchetti et al., 2020).

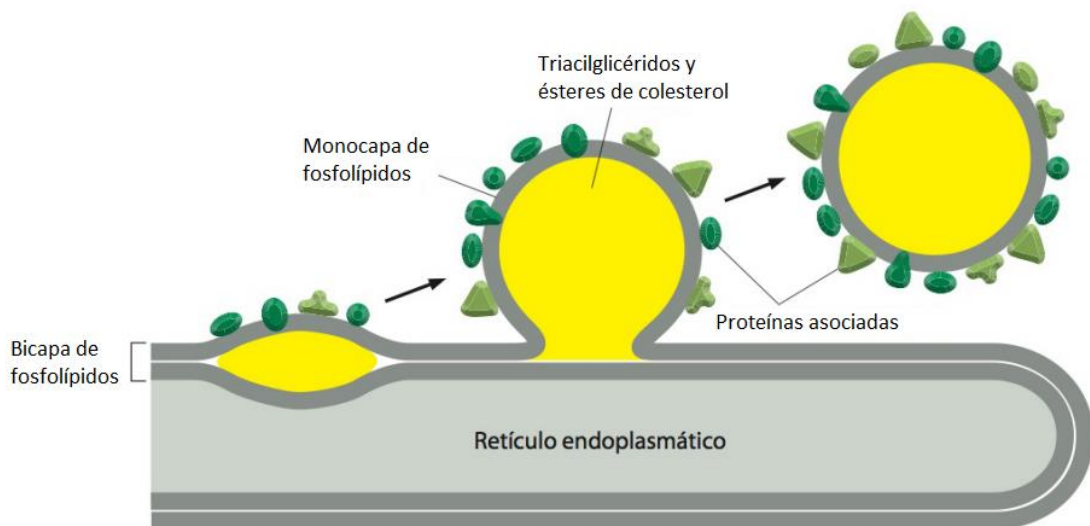


Figura 1.6: Formación de la gota lipídica.

Las GL (durante los períodos de privación de nutrientes o durante el crecimiento celular) impulsan procesos metabólicos y la biosíntesis de la membrana a través de los lípidos almacenados en las mismas (Beller et al., 2010).

Cualquier alteración de este ciclo metabólico, causada por factores ambientales, nutricionales o genéticos, puede estar directamente involucrado en la aparición de varias enfermedades metabólicas, como la obesidad, diabetes tipo II y la aterosclerosis (Bianchetti et al., 2020).

Así, por ejemplo, cuando los macrófagos incorporan más colesterol derivado de lipoproteínas del que excretan, el colesterol libre intracelular se convierte en EC, que se acumula en GL y da como resultado la morfología de las células espumosas (Tabas & Bornfeldt, 2016).

1.4 Tratamientos de aterosclerosis

Las estatinas son los fármacos utilizados actualmente para reducir los niveles elevados de colesterol y de esta manera prevenir las ECVs. Sin embargo, en algunos casos han demostrado efectos colaterales adversos, principalmente oculares, musculares y gastrointestinales (Djulbegovic & Hozo, 2019).

Los pacientes que no pueden tomar estatinas, ya sea porque les producen efectos secundarios significativos o porque aún tienen niveles de compuestos aterogénicos elevados luego del uso de las mismas, se beneficiarían con una terapia alternativa o complementaria para optimizar los resultados (Gupta et al., 2020). Recientemente, la mayoría de los fármacos modernos se han desarrollado a partir de compuestos aislados de plantas medicinales, en función de sus usos y/o aplicaciones farmacológicas. El papel de los productos naturales en el desarrollo de fármacos ha ido en aumento, no solo cuando los compuestos bioactivos se emplean directamente como agentes terapéuticos, sino también cuando se utilizan como materia prima para la síntesis de fármacos o como modelo base para nuevos compuestos biológicamente activos (Andrade et al., 2016).

1.5 Aceites esenciales y aterosclerosis

Los aceites esenciales (AEs) son una mezcla de compuestos terpénicos, especialmente monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes, aldehídos, éteres, ésteres, cetonas y fenoles (A. C. De Groot & Schmidt, 2016b). Se obtienen a partir de plantas aromáticas o frutos, generalmente por destilación al vapor del material vegetal, y son compuestos volátiles, naturales y complejos, que poseen un fuerte olor característico (A. C. De Groot & Schmidt, 2016a).

Los terpenos (Figura 1.7) representan más de 30.000 compuestos de metabolitos secundarios diferentes que desempeñan funciones distintas en los diferentes organismos donde se presentan. Se puede encontrar una amplia diversidad estructural de terpenos en bacterias, hongos, algas, plantas (abundantemente en AEs, resinas y ceras) y algunos animales (principalmente insectos y organismos marinos) pero no se encuentran en mamíferos. Estos productos contienen isopreno como origen común biosintético (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012).

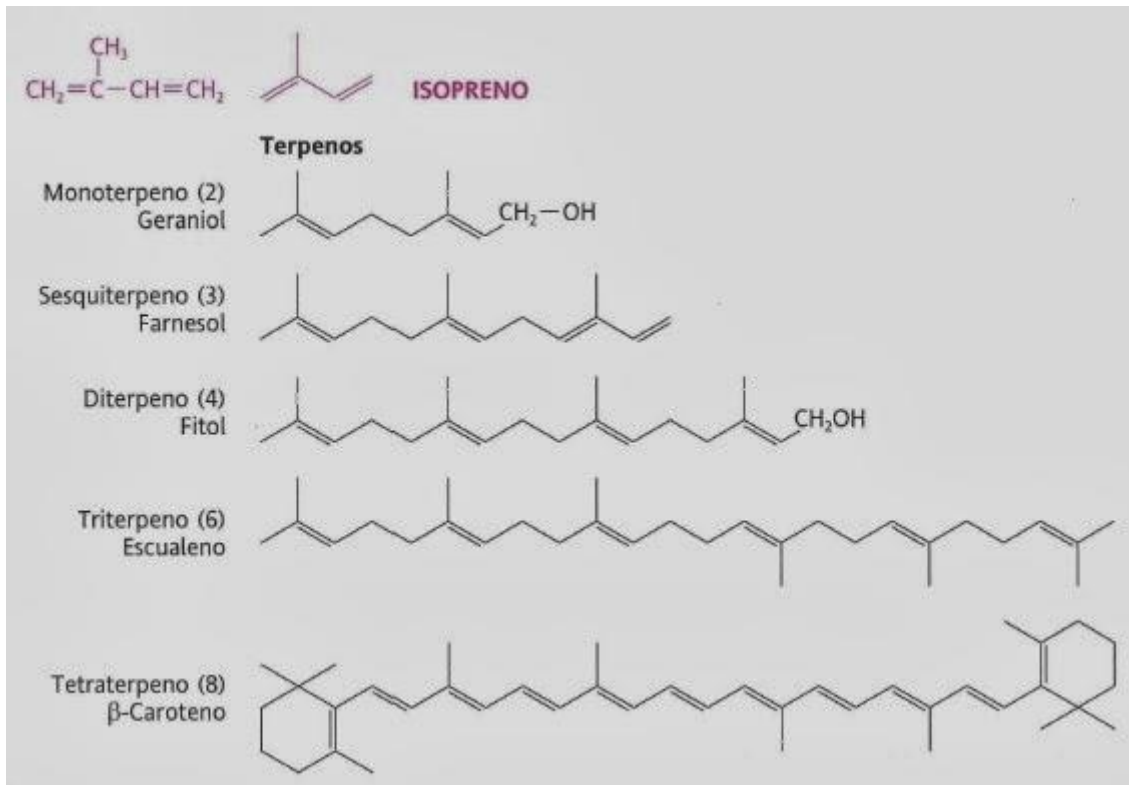


Figura 1.7: Molécula de isopreno y diferentes compuestos terpénicos.

Los terpenos han demostrado poseer una amplia gama de actividades biológicas tales como antimicrobianas, antiinflamatorias, antiulcerogénicas, anticancerígenas y antioxidantes, entre otras (Bakkali et al., 2008; A. C. De Groot & Schmidt, 2016a).

La actividad antioxidante de los terpenos parece depender de sus características estructurales. Estas características le permiten a los terpenos eliminar EROs y también modular el sistema antioxidante endógeno (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012).

La utilidad de los AEs es diversa y de múltiples usos: aromaterapia, perfumes, saborizantes alimentarios, limpiadores y farmacológicos (antisépticos y cicatrizantes entre otros) (Plant et al., 2019). Los AEs se pueden administrar por vía oral, ya que están incluidos en el listado de productos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) en alimentos y bebidas, según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos. Se ha demostrado también su inocuidad al ser aplicado sobre la piel o por inhalación (A. C. De Groot & Schmidt, 2016a).

Varios estudios sugieren que, si se emplean los AEs para el tratamiento de ECVs, éstos podrían proporcionar beneficios para la salud con menores o nulos efectos secundarios adversos (como los que producen las estatinas) (Montero-Villegas et al., 2017).

La composición de cada AE puede variar según la parte de la planta de la que se extraiga, incluso plantas de una misma especie pueden diferenciarse entre sí porque presentan una composición química diferente (quimiotipo). Esto se debe a la influencia

de varios factores: ambientales (clima, condiciones del suelo y fertilización), cosecha y técnicas de obtención de los AEs, entre otras (A. C. De Groot & Schmidt, 2016b).

Los AEs utilizados en este trabajo fueron extraídos de las plantas *Lippia alba linalool*, *Lippia alba dihidrocarvona*, *Calamintha officinalis*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita*, *Origanum x applii* y *Rosmarinus officinalis* (Figura 1.8).



Figura 1.8: Plantas aromáticas a partir de las cuales se obtuvieron los AEs utilizados en este trabajo.

- *Lippia alba*

El género *Lippia* comprende cerca de 200 especies distribuidas por las regiones tropicales, subtropicales y templadas de América, África y Asia. *L. alba* es un arbusto aromático comercialmente cultivado en América Latina y en Argentina se la conoce como salvia morada. El AE de *L. alba* tiene diversos usos comerciales y tradicionales asociados a su acción terapéutica empleándose como analgésico, antiinflamatorio, antifúngico, antiolesterolémico, repelente, antimicrobiano, antiviral y en enfermedades intestinales y hepáticas (Linde et al., 2016).

En este trabajo se utilizaron dos quimiotipos de AEs de *Lippia alba*: *Lippia alba linalool* (LaL) y *Lippia alba dihidrocarvona* (LaD).

- *Calamintha officinalis*

Calamintha officinalis (Co) es una planta aromática que se ha utilizado desde la antigüedad por sus propiedades conservantes y medicinales. Su AE se utiliza en la cocina como aromatizante y también para mejorar el sabor y la fragancia de varios productos farmacéuticos. También posee actividad antiséptica y cicatrizante, por lo que se utiliza en picaduras y heridas de insectos (Monforte et al., 2011).

- *Eucalyptus globulus*

En la medicina popular tradicional, el AE de eucalipto se ha utilizado tradicionalmente para tratar trastornos e infecciones del tracto respiratorio como faringitis, bronquitis y sinusitis, siendo la vía de administración inhalatoria la más utilizada (Cermelli et al., 2008).

El AE de *Eucalyptus globulus* (Eg) ha demostrado tener también propiedades antidiabéticas y antioxidantes, siendo capaz de reducir el estrés oxidativo disminuyendo el nivel de glucosa plasmática en ratas diabéticas (Dhakad et al., 2018).

- *Mentha*

El AE de *Mentha* tiene muchas aplicaciones farmacéuticas, ya que es utilizado para aliviar espasmos musculares, neuralgias, dolor de cabeza y dolor de muelas. Además, a menudo se consumen por vía oral para aliviar el malestar estomacal, las náuseas y otros trastornos intestinales (A. De Groot & Schmidt, 2016). La menta y su AE se utilizan ampliamente para aromatizar chicles, pastillas para la tos, dulces, bebidas alcohólicas, pasta de dientes y ambientadores bucales, y también se emplean para perfumes, productos cosméticos y en la industria del tabaco (Plant et al., 2019).

En este trabajo se utilizaron dos AEs de *Mentha* provenientes de distintas especies: *Mentha piperita* (Mp) y *Mentha arvensis* (Ma).

- *Origanum x applii*

La planta *Origanum x applii* (Oa), popularmente conocida como orégano u orégano criollo, es un híbrido de *Origanum vulgare* y *Origanum majorana* que se ha utilizado como condimento alimentario desde la antigüedad. El AE del quimiotipo *Origanum vulgare* tiene propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Rodríguez-García et al., 2016).

- *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis (Ro), popularmente conocida como romero, es una planta perteneciente a la familia *Lamiaceae* que se puede utilizar como especia para cocinar, conservante natural en la industria alimentaria, planta ornamental y medicinal. Los efectos demostrados por esta planta incluyen: capacidad para atenuar enfermedades tales como el asma y aterosclerosis, acciones antioxidantes y antiinflamatorias del ácido rosmarínico, control de la hipercolesterolemia y efectos anticancerígenos y antiproliferativos (Oliveira et al., 2019).

The background of the slide is a repeating pattern of various chemical structures. These include alkenes, alcohols, ketones, and complex polycyclic systems. Some structures feature red oxygen atoms and black wedges/dashes to indicate stereochemistry. The structures are scattered across the page, creating a textured, scientific background.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

En este trabajo nos proponemos encontrar aceites esenciales (AEs) obtenidos de plantas de disponibilidad y/o producción regional con potencial farmacológico para la prevención y/o disminución de las enfermedades cardiovasculares (ECVs).

2.2 Objetivos específicos

- *Determinar el efecto de los AEs sobre la viabilidad de células espumosas derivadas de monocitos humanos THP-1 (células involucradas en los procesos de inicio y progresión de ECVs).*

Se realizan ensayos de viabilidad celular con un amplio rango de concentraciones de AEs para determinar aquellos con mayor potencial de inhibir la viabilidad de las células espumosas y para definir las concentraciones de trabajo a utilizar.

- *Identificar los AEs con mayor potencial para disminuir los depósitos lipídicos.*

Se realiza un screening de distintos AEs para identificar aquellos con mayor capacidad de disminuir los depósitos lipídicos intracelulares en células espumosas.

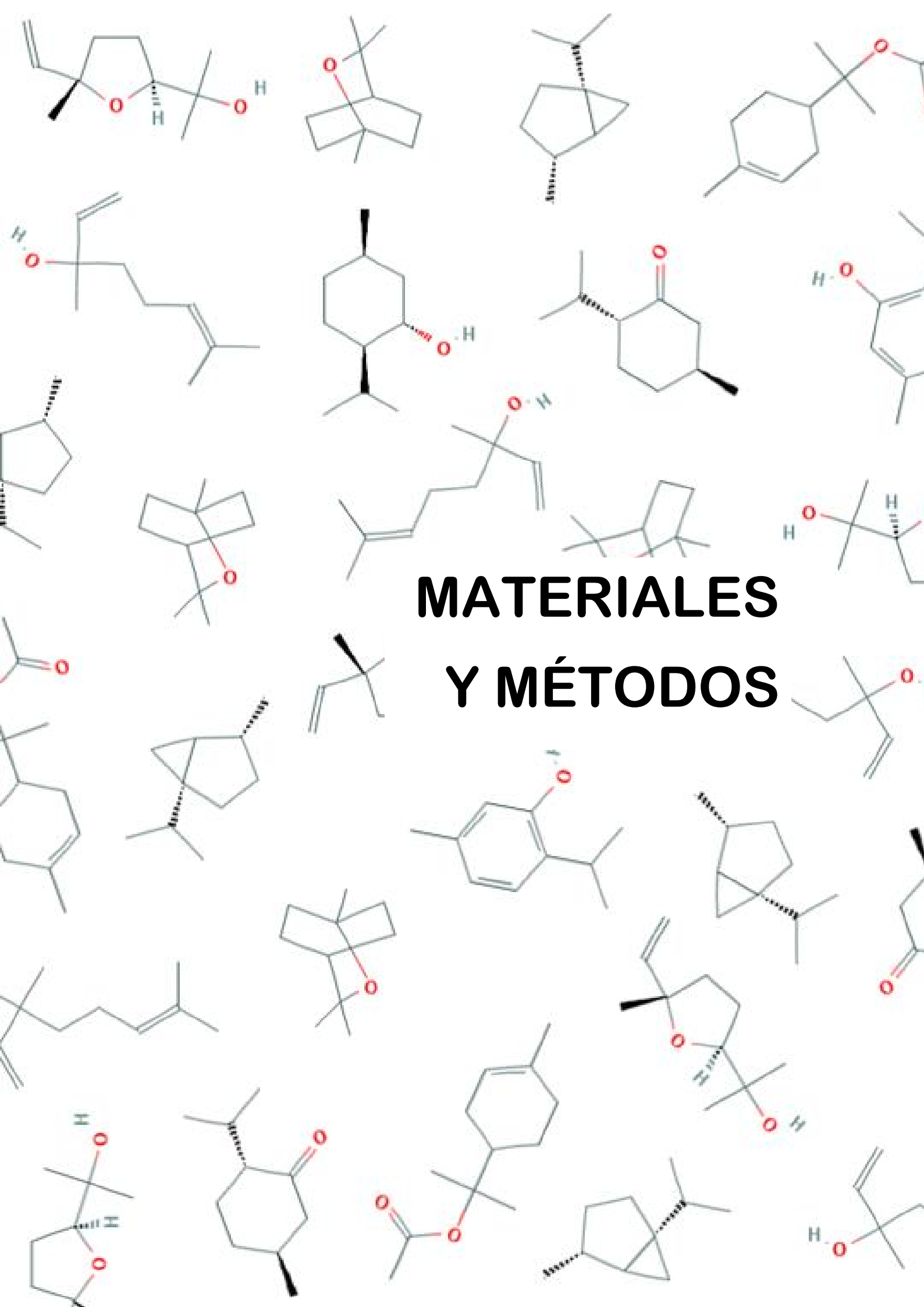
- *Identificar los AEs con mayor potencial antioxidante.*

Se realiza un screening de distintos AEs evaluando los niveles de peroxidación lipídica en LDL nativas incubadas con un agente inductor del estrés oxidativo.

- *Caracterizar los AEs para identificar los compuestos con mayor potencial para inhibir la viabilidad celular de las células espumosas, disminuir los depósitos lipídicos y actuar como agente antioxidante.*

Se analizan los AEs seleccionados por cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masas para la cuantificación e identificación de sus componentes volátiles.

Se realiza un análisis estadístico por la técnica de regresión de los mínimos cuadrados parciales (PLS) para relacionar los componentes de los AEs con las distintas variables estudiadas (viabilidad celular, contenido lipídico y actividad antioxidante).



**MATERIALES
Y MÉTODOS**

3.1 Reactivos

Los reactivos inorgánicos y solventes de grado analítico se obtuvieron de Merck, Analyticals Carlo Erba y Sigma-Aldrich.

El medio de cultivo celular utilizado fue Roswell Park Memorial Institute (RPMI-DIPIACELL RPMI 1640) al cual se le adicionó suero fetal bovino (SFB) 10% (Natocor), estreptomicina 0.01 g/L (Richet) y ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) 4 g/L.

3.2 Aceites esenciales

Las plantas aromáticas *Lippia alba linalool* (LaL), *Lippia alba dihidrocarvona* (LaD), *Calamintha officinalis* (Co), *Mentha piperita* (Mp), *Eucalyptus globulus* (Eg), *Origanum x applii* (Oa), *Mentha arvensis* (Ma) y *Rosmarinus officinalis* (Ro), fueron cultivadas en la Estación Experimental Julio Hirschhorn (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP).

Los AEs de las plantas antes mencionadas se obtuvieron por hidrodestilación y fueron donados por la Dra. Sonia Viña, Profesora titular de la cátedra de Bioquímica y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

3.3 Línea celular: THP-1

Para los experimentos se utilizó la línea de monocitos THP-1 (Figura 3.1), procedentes de una leucemia monocítica aguda humana, la cual fue adquirida del banco de células del INIBIOLP (Facultad de Ciencias Médicas, UNLP).

Estas células fueron mantenidas en suspensión en botellas plásticas de cultivo T25 en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB en estufa a 37 °C y 5% de CO₂.



Figura 3.1: Células THP-1 observadas en microscopio óptico (aumento 20X).

3.3.1 Construcción del modelo de células espumosas

Para diferenciar las células monocíticas THP-1 a macrófagos se las incubó con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en una concentración final de 5 ng/mL durante 24 horas, lo que resultó en células con adherencia (Chanput et al., 2014). Posteriormente, el medio se reemplazó con medio de cultivo fresco y las células se incubaron con LDLox en una concentración final de 40 µg/mL durante 72 horas para establecer el modelo de células espumosas derivadas de macrófagos THP-1.

3.3.2 Tratamiento de las células

Todos los AEs utilizados para los tratamientos fueron disueltos en etanol. Este vehículo se añadió en una concentración final tal que no resultara tóxico para las células (0.4 % v/v).

Se trabajó con concentraciones crecientes de los AEs. Se partió de una solución madre de los mismos de 100 µL/mL, a partir de la cual se prepararon soluciones de 10, 50, 200, 500 y 1000 µL/L para realizar los ensayos.

Las células fueron sembradas en placas de 96 wells (125.000 células/well) para los ensayos de MTT y Oil Red O, y en placas de 6 wells (2.200.000 células/well) para la determinación de colesterol libre, EC y TAG.

El tratamiento de las células se esquematiza en la Figura 3.2:

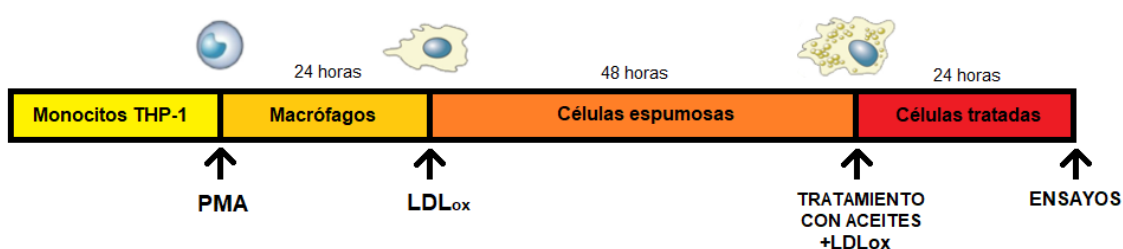


Figura 3.2: Línea temporal de la diferenciación y tratamientos de las células THP-1.

3.4 Obtención y oxidación de LDL

Se utilizó plasma donado por el Banco de sangre del Instituto de Hemoterapia de la Plata. La densidad del plasma fue ajustada a 1.21 g/mL con bromuro de sodio en presencia de EDTA 1% y se ultracentrifugó a 49000 rpm durante 44 horas a 10°C. Luego, las lipoproteínas fueron separadas y purificadas en una columna Sephacril S300, utilizando como eluyente buffer Tris 10 mM, NaCl 0.15 M, azida 0.01%, EDTA 1%, pH=8. Las LDL obtenidas fueron dializadas con un buffer Tris-HCl (10 mM, pH=7.4) conteniendo EDTA 1 mM durante 24 horas. Luego, las LDL fueron oxidadas por exposición a sulfato de cobre (5 µmol/L) durante 8 horas a 37°C; la oxidación se detuvo por refrigeración y adición de hidroxitolueno butilado (100 µM). Por último el Cu⁺² fue removido mediante diálisis en PBS a pH=7.4.

3.5 Recuento celular

Con el objetivo de sembrar una cantidad de células adecuada para cada experimento, se procedió a realizar el conteo celular empleando el método de tinción por exclusión del colorante azul tripán. Éste es un colorante que se utiliza para poder diferenciar las células vivas de las muertas. Este método se basa en el principio de que las células muertas pierden permeabilidad selectiva y captan el colorante, observándose de un color azulado característico, mientras que las células vivas excluyen el colorante, por lo tanto no se colorean.

Para realizar el recuento se tomó una alícuota de la suspensión celular (generalmente de 40 µl) y se diluyó en una solución 0.4% (p/v) de azul tripán (Anedra) en PBS (generalmente una dilución 1:2). La suspensión celular obtenida se colocó en una cámara de Neubauer y se procedió a realizar el conteo de las células vivas que, al mantener su membrana celular intacta, no incorporan el colorante y se observan bajo el microscopio como células refringentes. Por el contrario, las células muertas se diferencian bajo el microscopio por su color azul, debido al ingreso del azul tripán a las mismas.

Se contaron las células vivas de cada cuadrante utilizando el criterio de inclusión/exclusión de las células observadas sobre los lados de los mismos como se muestra en la Figura 3.3: las células halladas sobre los bordes rojos no fueron incluidas en el conteo, mientras que las células que se encontraban sobre los bordes amarillos sí se incluyen en el mismo.

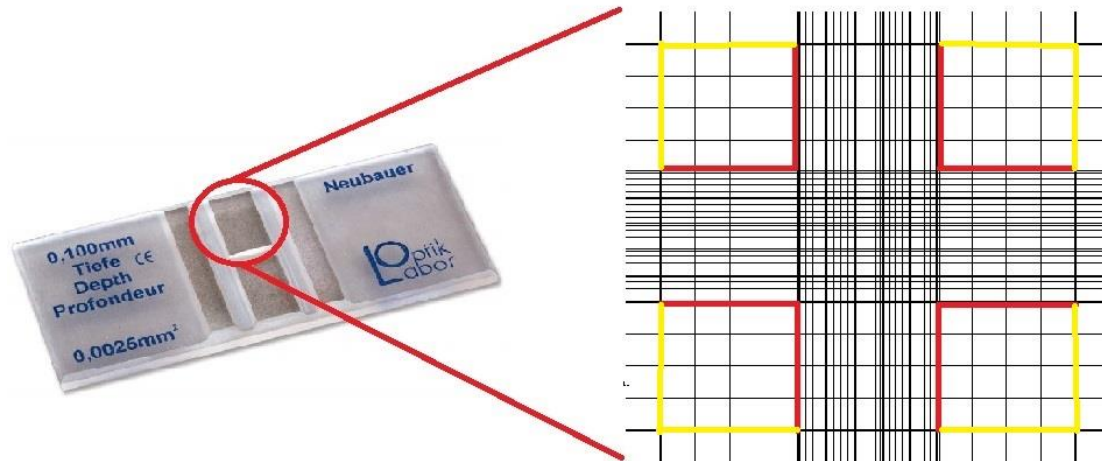


Figura 3.3: Cámara de Neubauer en la cual se realizaron los recuentos celulares. Las células vivas sobre los bordes rojos no fueron incluidas como células del cuadrante; por el contrario, las células sobre los bordes amarillos fueron consideradas en el conteo.

Luego, se determinó la concentración celular (C) de la suspensión inicial con la siguiente fórmula:

$$C = \frac{N^{\circ} \text{ células contadas} * 10000 * \text{factor de dilución}}{\text{número de cuadrantes}}$$

Una vez calculada la concentración de células vivas en la suspensión celular inicial (C_i), se emplea la siguiente ecuación para preparar la suspensión celular requerida para un experimento determinado.

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

$$V_i = (V_f * C_f) / C_i$$

Donde el volumen inicial es V_i , volumen final es V_f y concentración final es C_f . De esta manera es posible calcular el volumen que se necesita (V_i) para obtener una suspensión celular con la concentración de células que se requiere (C_f) para un experimento determinado.

3.6 Evaluación de viabilidad celular (Ensayo de MTT)

El ensayo de reducción de tetrazolio o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniletetrazol (MTT) es un ensayo colorimétrico para determinar viabilidad celular. Se basa en la conversión de sales de tetrazolio (amarillas y solubles) a cristales de formazán (azules e insolubles) producida por la activación de las deshidrogenasas dependientes de NADH o NADPH de las mitocondrias de las células vivas (Figura 3.4). Por lo tanto, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, que se mide a una absorbancia de 560 nm (Mosmann, 1983).

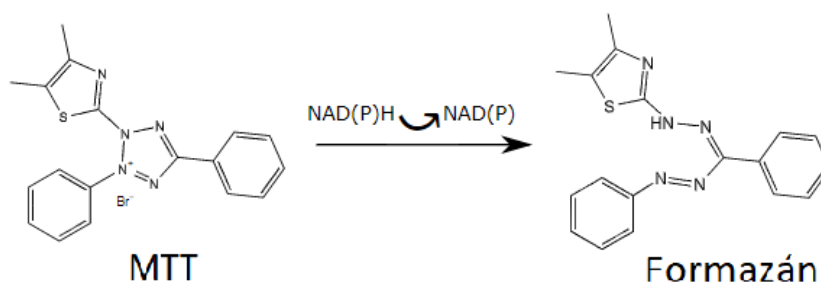


Figura 3.4: Reacción de conversión de sales de tetrazolio a cristales de formazán dependiente de NADH o NADPH.

Este ensayo refleja la viabilidad de las células presentes, y la sensibilidad de las células a un determinado compuesto se especifica usualmente como la concentración del mismo que se requiere para lograr un 50% de inhibición de la viabilidad comparado con células controles (IC 50 ó concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular).

Para realizar los ensayos de MTT se sembraron 125.000 células/well en placas de 96 wells. Después de que los monocitos THP-1 se diferenciaron a macrófagos, éstos fueron transformados a células espumosas y tratadas con los correspondientes AEs como se detalló previamente. Luego, se eliminó el medio de cultivo a las células y se agregó a cada well 100 μ L de solución MTT (0.5 mg/mL en PBS). Las células se incubaron en estufa a 37°C durante aproximadamente 30 minutos hasta observar la aparición de cristales azules (Figura 3.5). Posteriormente, se eliminó cuidadosamente la solución MTT de cada well, de forma de no remover el formazán. Se agregaron luego a cada well 100 μ l de ácido clorhídrico 0.04 M en isopropanol y la placa se llevó a agitación hasta disolución total de los cristales. Por último, se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, y se

utilizó una segunda longitud de onda para medir el background generado por la solución de MTT sin metabolizar, a 640 nm.

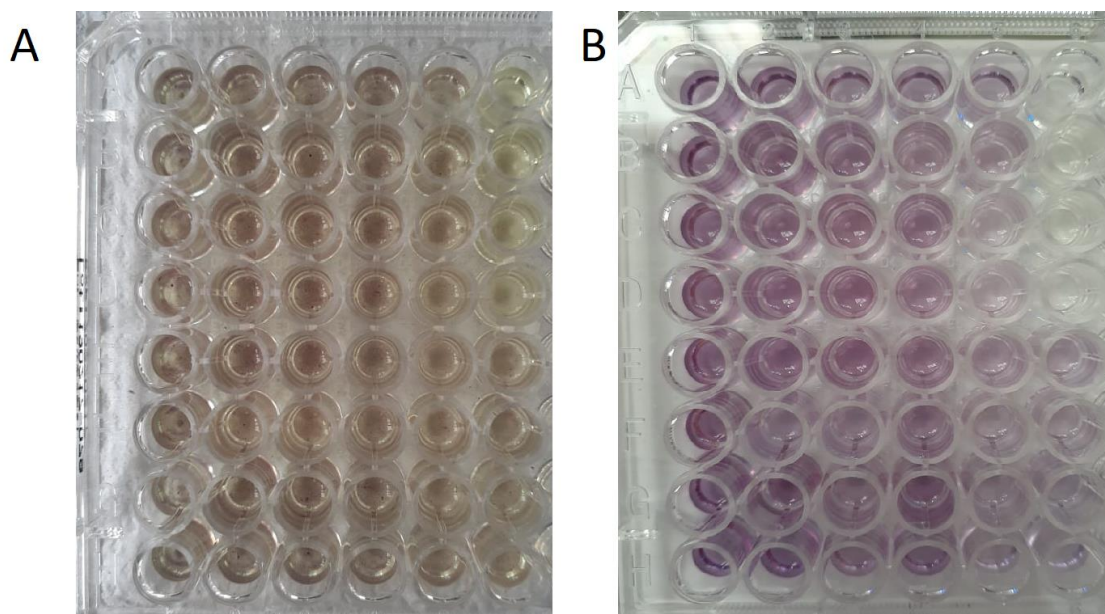


Figura 3.5: a) Cristales de formazán formados luego del agregado de solución de MTT. b) Disolución de los cristales en una solución de isopropanol-clorhídrico.

3.7 Separación de lípidos por cromatografía en capa fina (TLC)

La separación de los componentes lipídicos de las muestras se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés, *Thin-layer chromatography*). Se utilizaron placas de sílica gel que fueron activadas en estufa a 180°C durante una hora. Luego, se sembraron las muestras junto con estándares de colesterol y TAG. A continuación, la placa se introdujo en una cuba con una mezcla de solventes: hexano, éter etílico y ácido acético glacial en proporción 80:20:1 (con el fin de separar los lípidos neutros) y finalmente se colocó en una cuba saturada con yodo. Luego de unos minutos de exposición, se revelaron en la placa una serie de manchas como las que se observan en la Figura 3.6.

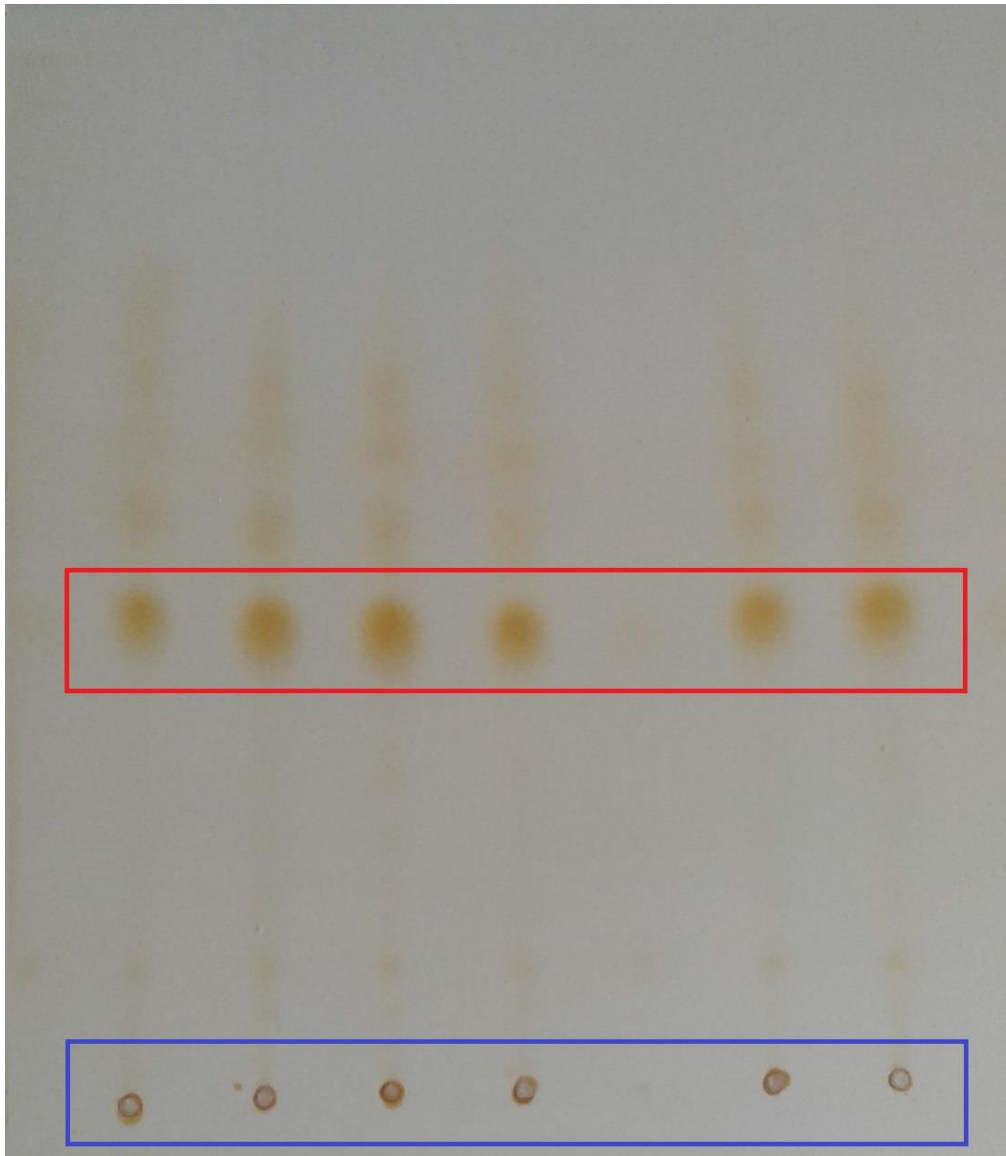
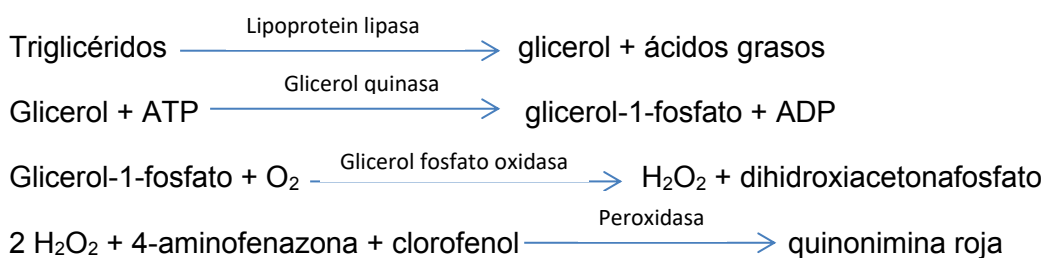


Figura 3.6: Placa de TLC luego de ser revelada en una cuba saturada con yodo. Los puntos de siembra y las manchas correspondientes a TAG se muestran en recuadros de color azul y rojo, respectivamente.

Para la cuantificación de TAG se raspó la porción de la placa en donde se encontraban (tanto de muestras como de estándares), se trasvasó la sílica a tubos de vidrio esmerilados, se agregó 2 ml de cloroformo a cada uno de ellos y los mismos se guardaron en heladera para su posterior análisis.

Se utilizó el kit TG color de Wiener lab (Rosario, Argentina) para determinar la cantidad de TAG presente en las muestras. La secuencia de reacciones que ocurren es la siguiente:



Se siguieron los pasos del protocolo (ver Anexo) y las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se trasvasaron 180 μL de cada una de las muestras a una placa de 96 wells y se midió la absorbancia a 505 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector. La cantidad de TAG de cada muestra se determinó a partir de una curva de calibración y los resultados se expresaron en relación a los μg de proteína presentes en las muestras.

Para la cuantificación del colesterol libre y EC se aplicó en forma de spray una solución ácida de cloruro férrico sobre la placa de TLC que fue calentada en estufa a 300°C (Lowry, 1968). Una vez realizado este procesamiento de carbonización, se cuantificaron los lípidos por densitometría con el programa Image J (Figura 3.7). La cantidad de colesterol de cada muestra se determinó a partir de una curva de calibración y los resultados se expresaron en relación a los μg de proteína presentes en las muestras.

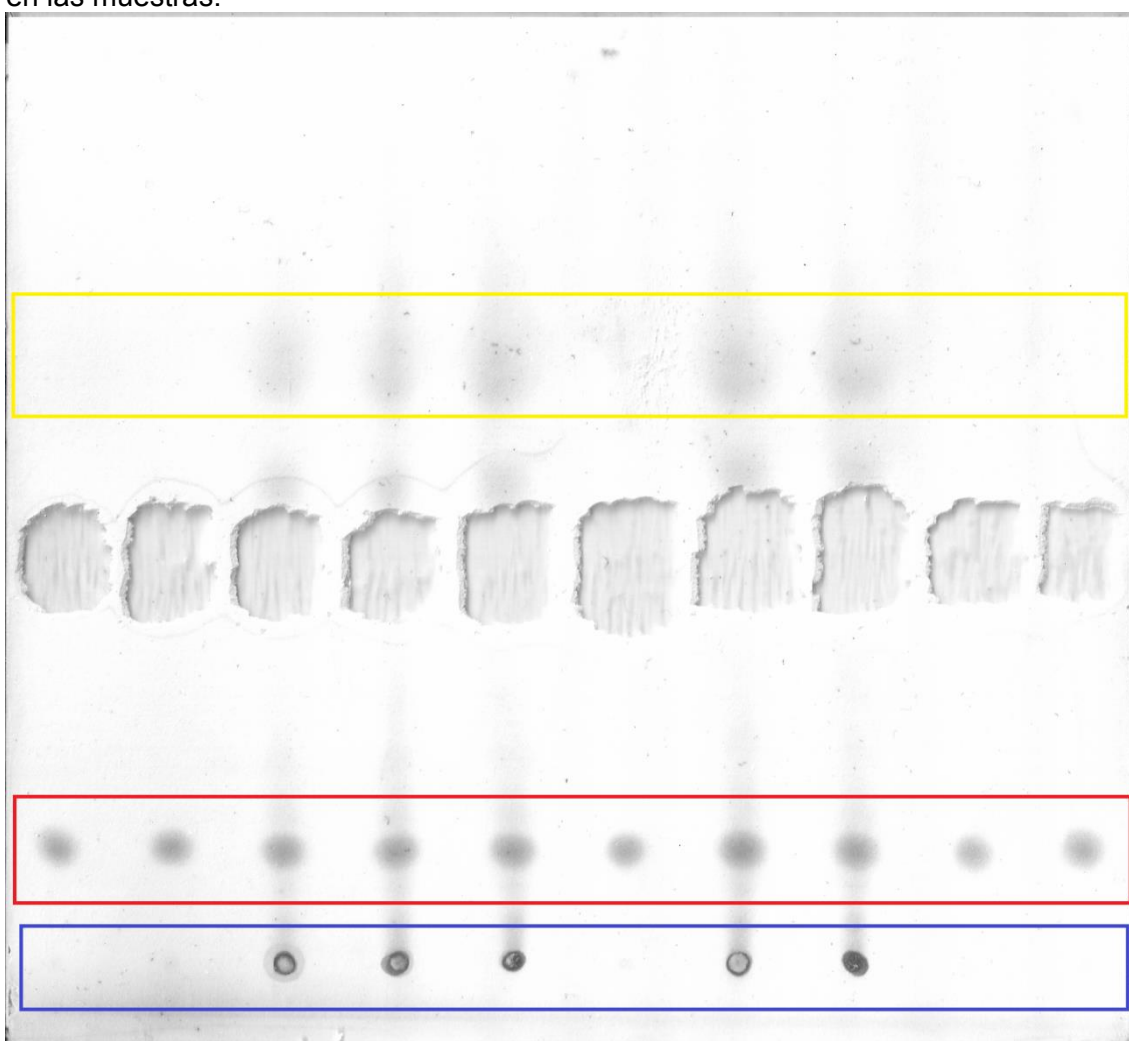


Figura 3.7: Placa de TLC luego del proceso de carbonización. Los puntos de siembra y las manchas correspondientes a colesterol libre y ésteres de colesterol se muestran en recuadros de color azul, rojo y amarillo, respectivamente.

3.8 Cuantificación de proteínas

3.8.1 Ensayo de Lowry

Este método (Lowry et al. 1951) consta de dos etapas:

1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de tirosina que participan en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2) Se produce la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Figura 3.8).

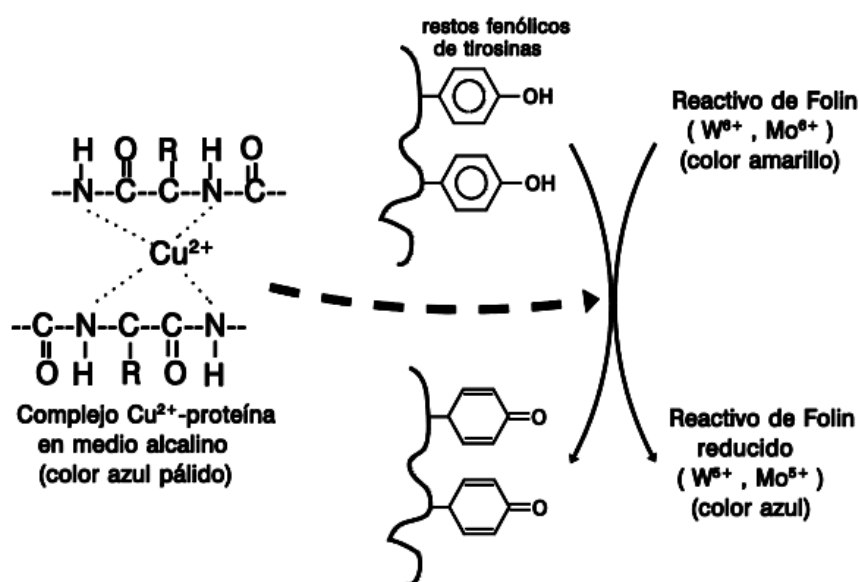


Figura 3.8: Reacción producida entre la proteína y los reactivos del ensayo de Lowry

Se siguieron los pasos del protocolo (ver Anexo) y una vez transcurrido el tiempo de incubación, se trasvasaron 200 μL de cada muestra en una placa de 96 wells y se leyó la absorbancia a 620 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector.

3.8.2 Ensayo de Bradford

El ensayo de Bradford es uno de los métodos más utilizados para la determinación de la concentración de proteínas. Se basa en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas en solución. El colorante libre existe en cuatro formas iónicas. La forma azul más aniónica se une a las proteínas y absorbe a 590 nm de longitud de onda (Figura 3.9). La concentración de

proteínas puede ser evaluada determinando la cantidad de colorante en su forma iónica azul y midiendo la absorbancia de la solución (Bradford 1976).

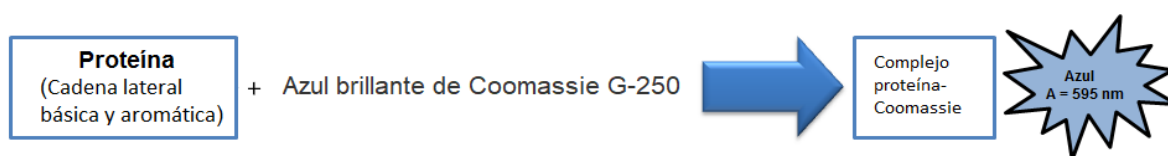


Figura 3.9: Reacción producida entre la proteína y el azul brillante Coomassie G-250.

Se preparó cada muestra en una placa de 96 wells (ver Anexo) y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector.

3.9 Análisis del efecto antioxidante por evaluación de peroxidación lipídica (Ensayo de TBARS)

La peroxidación lipídica es un término que hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de radicales libres que capturan electrones de los lípidos de las membranas celulares generando peróxidos lipídicos que se descomponen y forman compuestos más complejos y reactivos, como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonal. En la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que contienen múltiples dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metilenos que poseen hidrógenos particularmente reactivos.

Ciertos ensayos diagnóstico están disponibles para la cuantificación de productos finales de la peroxidación lipídica, específicamente el MDA. El ensayo más comúnmente empleado utiliza sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El MDA forma un aducto con el ácido tiobarbitúrico (1:2) que puede ser medido colorimétricamente (absorbancia a 535 nm) o por fluorescencia (540 nm de excitación, 590 nm de emisión). Los TBARS se determinan a partir de una curva de MDA estándar (Ohkawa, Ohishi, and Yagi 1978) y se normalizan en base a los μg de proteínas presentes en cada muestra.

Para evaluar el efecto de los AEs sobre la oxidación lipídica de las LDL nativas (sin oxidar) se utilizó el CuSO_4 como agente inductor del estrés oxidativo. Para este ensayo, se preincubaron soluciones de LDL nativas con diferentes concentraciones de AEs (en concentraciones equivalentes a los IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ en cultivo celular) durante media hora en un baño térmico con agitación a 37°C. Luego se agregó CuSO_4 para alcanzar una concentración final de 5 mM y las muestras se incubaron nuevamente durante dos horas y media en el baño térmico. Se añadió un control sin sulfato con el fin de verificar la oxidación de las LDL nativas.

Luego se tomaron 100 μL de cada muestra para medir la peroxidación lipídica mediante el ensayo de TBARS empleando el protocolo que se detalla en el Anexo.

Las muestras se incubaron a 95°C por 60 minutos. Posteriormente, se dejaron enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron para eliminar partículas

que pudieran interferir con la medición de la absorbancia. Por último, se cargaron 200 μL en cada well en una placa de 96 wells y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector.

3.10 Tinción celular con Oil Red O

El Oil Red O es un colorante histoquímico hidrofóbico que tiñe principalmente lípidos neutros. En este experimento, las células en cultivo se tiñeron con el colorante siguiendo los siguientes pasos: primeramente se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS durante una hora en agitación. Luego, se eliminó el paraformaldehído y se realizaron dos lavados con PBS durante 10 minutos cada vez. Para la tinción, se preparó en el momento la solución de trabajo a partir de 4 ml de agua bidestilada y 6 ml de solución stock de Oil Red O (0.5 g en 100 mL de isopropanol), la cual se filtró dos veces con papel Whatman #1. Luego, se incubaron las células con esta solución durante 20 minutos en agitación. Se eliminó el colorante y se lavó durante 10 segundos con una solución de isopropanol 60% (v/v) en H_2O destilada. Posteriormente, se realizaron 6 lavados sucesivos con PBS y, por último, se agregó isopropanol para extraer el colorante incorporado en las células. Después de 30 minutos con agitación, se procedió a medir la cantidad de colorante liberado cuantificando la absorbancia a 490 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector. Los resultados se expresaron en relación a los μg de proteína presentes en cada muestra.

3.11 Análisis de aceites esenciales por cromatografía gaseosa capilar-espectrometría de masas

Para la toma de muestras de los componentes volátiles de los AEs, se empleó la técnica microextracción en fase sólida o SPME (por sus siglas en inglés, *solid-phase microextraction*) que consiste en poner en contacto la fase gaseosa con una fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente y protegida con una aguja de metal. Se pueden utilizar dos tipos de procesos SPME de fibra, el de espacio de cabeza (HS) y el de inmersión directa (DI), para extraer analitos en un solo paso. HS-SPME se utiliza para extraer analitos volátiles y semivolátiles, mientras que DI-SPME se utiliza para extraer analitos no volátiles (Kataoka, 2015).

Se procedió entonces a colocar 1 μL de cada uno de los AEs en viales de 2 mL sellados con septum de goma. Con la aguja de metal se perforó el septum de goma, y se expuso el material adsorbente (fibra de PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenceno) de 65 μm de espesor (Supelco, Bellefonte, USA)) al HS durante 2 minutos a temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$). Luego, se retiró la fibra del vial y se inyectó en el cromatógrafo. En el inyector del cromatógrafo se expone el material adsorbente a altas temperaturas, y los analitos se desorben en el interior del mismo.

El análisis por cromatografía gaseosa capilar-espectrometría de masas (CGC-MS) fue realizado en un cromatógrafo HP 6890 acoplado a un detector selectivo de masas 5975C VL Agilent. La columna utilizada para separar la mezcla fue la ZB-5HT Inferno (30 m, 0.25 mm d.i., 0.25 μm film). El inyector se operó en modo splitless a 250 $^{\circ}\text{C}$ y la temperatura del horno se programó a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 300 $^{\circ}\text{C}$ y con un tiempo de espera de 3 min a la temperatura final. La identificación de los componentes presentes en los AEs fue realizada por comparación de los espectros obtenidos con la

información de las bibliotecas de MS (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, 2005; Adams, 2007), con espectros y valores de índice de retención de Kovats (IK) (Kovats, 1965) previamente reportados en bibliografía. Las condiciones del detector del MS fueron: energía de ionización 70 eV; modo scan en el rango de masas 35-600 uma; línea de transferencia a 300°C; la cámara de ionización a 250°C y el cuadrupolo a 150°C (Figura 3.10).

La identificación de los compuestos obtenidos en los perfiles cromatográficos fue realizada por el Dr. Juan Roberto Girotti y el Bioq. Sergio Javier Mijailovsky mediante el análisis de los espectros de masas de cada pico.



Figura 3.10: Esquema del proceso utilizado para el análisis de AEs.

3.12 Análisis estadístico

Con un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS por sus siglas en inglés, *partial least squares regression*) se relacionaron los componentes de los AEs con las siguientes variables: metabolismo lipídico, viabilidad celular y actividad antioxidante. Previo al análisis, dichas variables fueron transformadas y centradas con la mediana. En el caso de las variables de viabilidad celular y actividad antioxidante, éstas también fueron escaladas utilizando la MAD (Armelius et al., 2001).

El análisis estadístico fue realizado por la estadística Dra. María Victoria Fasano.

The background of the slide is a repeating pattern of various chemical structures. These include alkenes, alcohols, ketones, and cyclic compounds like cyclohexanes and bicyclic systems. Some structures are highlighted with red oxygen atoms and hydrogen atoms, possibly indicating specific functional groups or reaction sites. The structures are scattered across the page, creating a dense, scientific aesthetic.

RESULTADOS

4.1 Transformación de macrófagos a células espumosas

Con el objetivo de establecer el modelo de células espumosas se utilizaron LDLox obtenidas en el laboratorio, tal como se explicó en la sección de Construcción del modelo de células espumosas en Materiales y Métodos. Se verificó la oxidación de las mismas mediante el ensayo de TBARS utilizando como control LDL nativas (LDL sin oxidar). El nivel de oxidación de los lípidos de las LDLox fue aproximadamente 31 % mayor que el que poseían las LDL nativas (Figura 4.1).

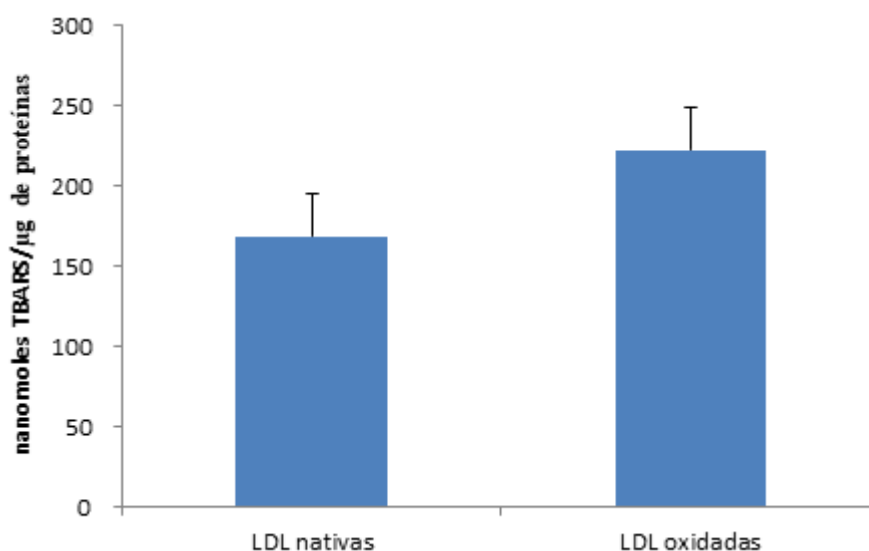


Figura 4.1: Nivel de oxidación de las LDL determinado por el ensayo de TBARS. Los datos se encuentran expresados como el promedio \pm SD.

La transformación de macrófagos a células espumosas se confirmó mediante la determinación de la cantidad del colorante Oil Red O medida por la relación Abs490/ μ g de proteína luego de incubar los macrófagos con LDLox. En el microscopio, luego de teñir los lípidos con Oil Red O, fue posible observar la aparición de una gran cantidad de gotas lipídicas en el interior de las células espumosas (Figura 4.2).

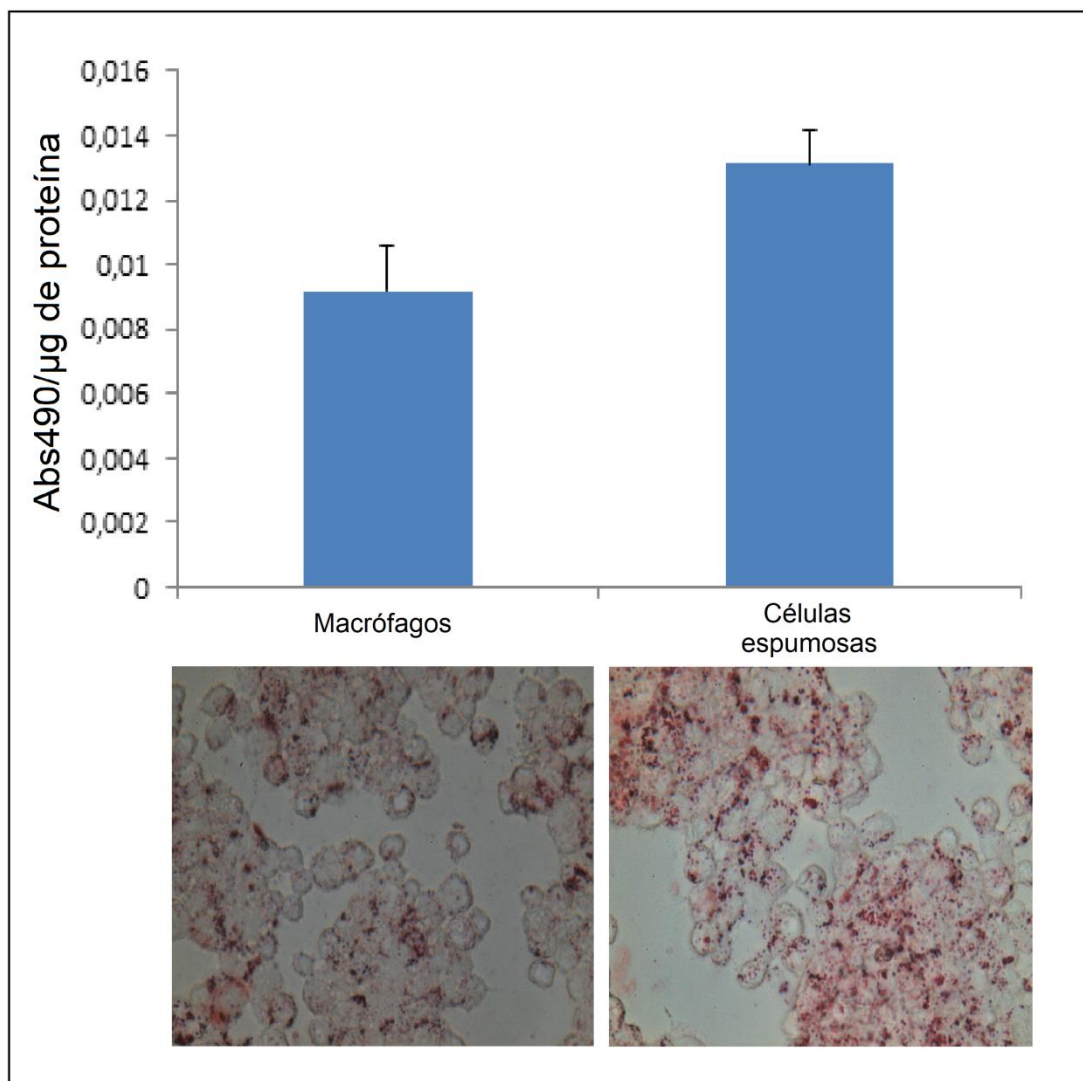


Figura 4.2: Transformación de macrófagos a células espumosas luego de la incubación con LDLox. Los datos se encuentran expresados como el promedio \pm SD (n=4-8).

4.2 Efecto de aceites esenciales sobre la viabilidad celular

Se realizaron ensayos de MTT para evaluar las concentraciones de los AEs que inhiben la viabilidad celular y determinar a su vez los porcentajes de inhibición a distintas concentraciones de los mismos. Con el fin de cumplir dicho objetivo, se incubaron las células espumosas THP-1 con concentraciones crecientes de cada AE (0 μ l/L, 50 μ l/L, 200 μ l/L, 500 μ l/L y 1000 μ l/L). Los resultados obtenidos en estos ensayos se graficaron en curvas de porcentaje inhibición de la viabilidad celular en función de la concentración de AEs (Figura 4.3). Luego, a partir de estas curvas se determinaron las concentraciones de cada AE que inhiben la viabilidad celular en un 30% (IC30) y en un 50% (IC50), resultados que son presentados en la Tabla 4.1.

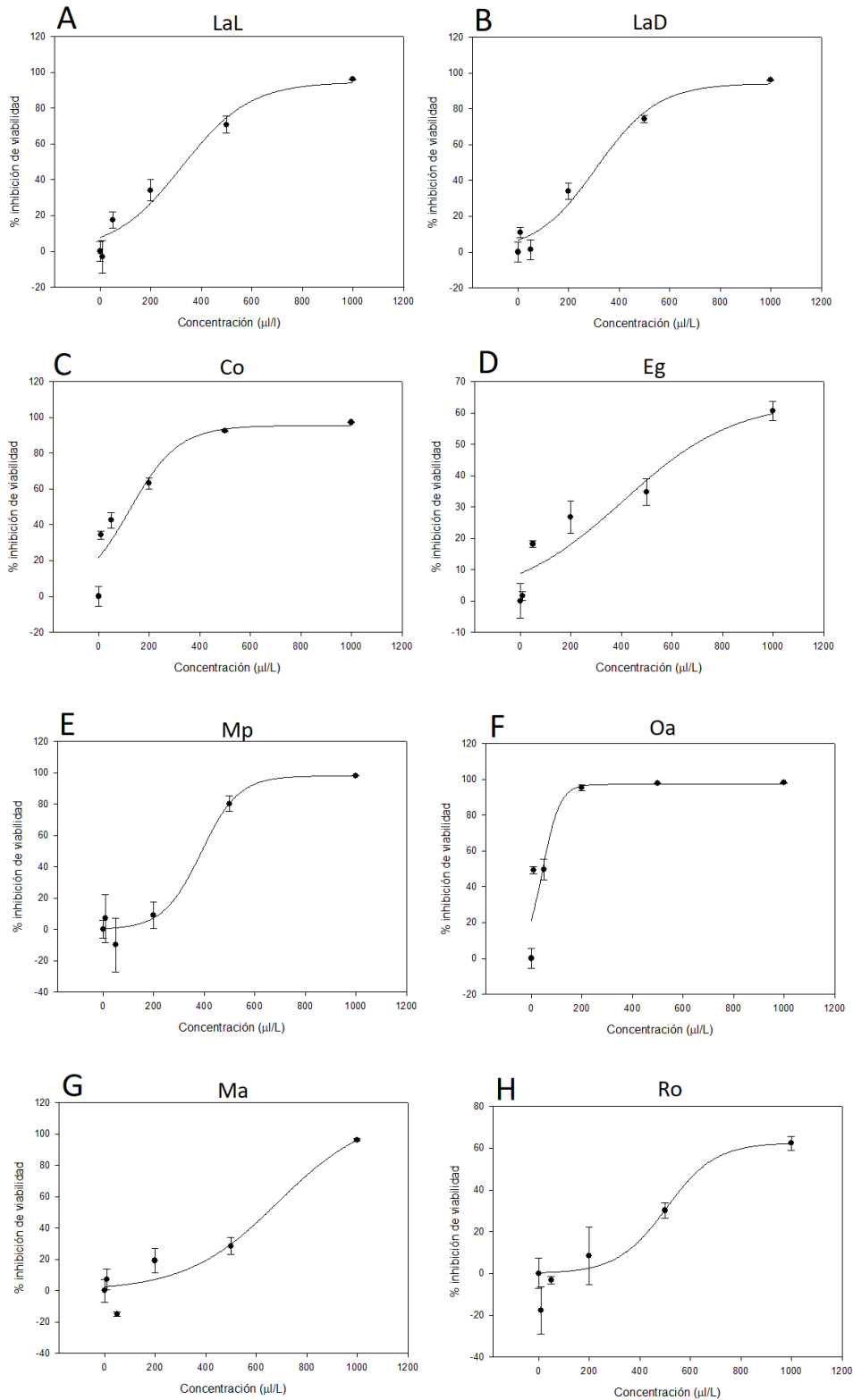


Figura 4.3: Efecto de los aceites esenciales (AEs) sobre la viabilidad de células espumosas THP-1 determinada por el ensayo MTT. A: *Lippia alba linalool* (LaL); B: *Lippia alba dihidrocarvona* (LaD); C: *Calamintha officinalis* (Co); D: *Eucalyptus globulus* (Eg); E: *Mentha piperita* (Mp); F: *Origanum x applii* (Oa); G: *Mentha arvensis* (Ma); H: *Rosmarinus officinalis* (Ro). Los datos se encuentran expresados como el promedio \pm SEM (n=4-8).

Tabla 4.1: Valores de concentración de los aceites esenciales (AEs) que inhiben la viabilidad de células espumosas THP-1 en un 30% (IC30) y un 50% (IC50).

	LaL	LaD	Co	Eg	Mp	Oa	Ma	Ro
IC 30 ($\mu\text{l/L}$)	220	218	45	380	320	18	500	491
IC 50 ($\mu\text{l/L}$)	338	324	130	690	390	45	640	638

Los valores para cada AE fueron determinados mediante ensayos de MTT. LaL: AE de *Lippia alba linalool*; LaD: AE de *Lippia alba dihidrocarvona*; Co: AE de *Calamintha officinalis*; Eg: AE de *Eucalyptus globulus*; Mp: AE de *Mentha piperita*; Oa: AE de *Origanum x applii*; Ma: AE de *Mentha arvensis*; Ro: AE de *Rosmarinus officinalis*.

En función de los resultados obtenidos, se determinó que el AE Oa es el que posee mayor efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células espumosas (IC50=45 $\mu\text{l/L}$).

Por otro lado se observó que los AEs Eg, Ma y Ro presentan valores de IC50 muy elevados por lo que no parecen inhibir la viabilidad de las células espumosas. Por este motivo es que en los siguientes ensayos se decidió utilizar sólo el AE Eg entre los previamente mencionados.

4.3 Efecto de los aceites esenciales sobre los niveles de colesterol en células espumosas

Se evaluó el efecto de los AEs sobre el contenido de colesterol libre, ésteres de colesterol (EC) y colesterol total presente en las células. Se trataron las células espumosas THP-1 con los diferentes AEs en una concentración equivalente a sus IC30. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje del control (Figura 4.4).

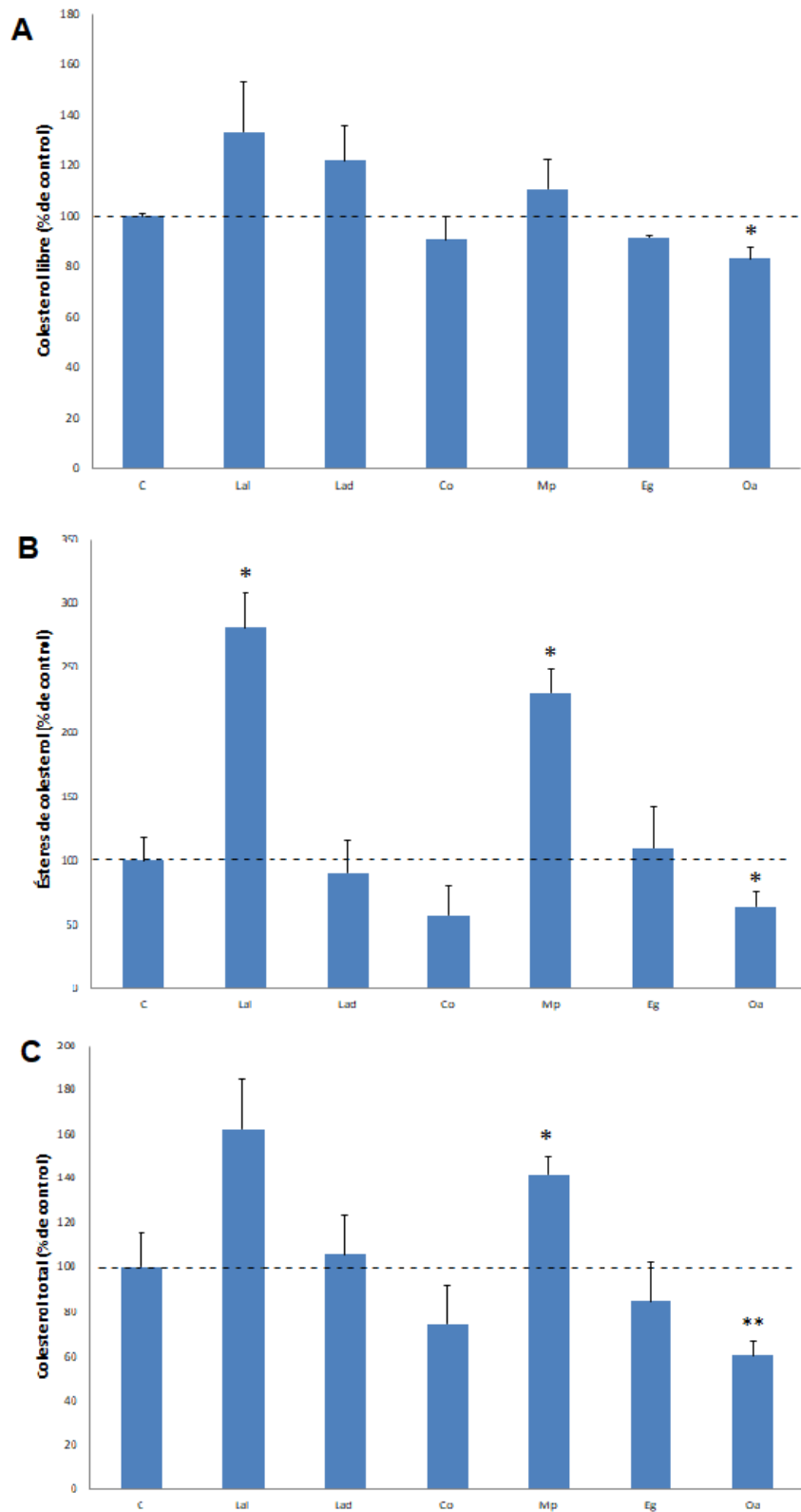


Figura 4.4: Efecto de los AEs sobre el contenido de (A) colesterol libre, (B) ésteres de colesterol y (C) colesterol total presente en células espumosas THP-1. Los datos se encuentran expresados como el promedio \pm SEM (n=3-8). *p<0.05; **p<0.01. LaL: *Lippia alba linalool*; LaD: *Lippia alba dihidrocarvona*; Co: *Calamintha officinalis*; Mp: *Mentha piperita*; Eg: *Eucalyptus globulus*; Oa: *Origanum x applii*.

Se observó que los AEs LaL y Mp muestran una tendencia a incrementar los niveles de colesterol total, aumentando tanto el colesterol libre como los EC.

El AE LaD incrementa los valores de colesterol libre en un 22% y disminuye los de EC en un 10%, generando finalmente un aumento en los valores de colesterol total.

Por otro lado el AE Eg reduce en un pequeño porcentaje los niveles de colesterol libre y aumenta los de EC. Finalmente, este AE provoca una disminución en el contenido de colesterol total.

Los AEs Oa y Co tienden a reducir los niveles de colesterol total, disminuyendo tanto el colesterol libre como los EC. Sin embargo, sólo el tratamiento con Oa produce diferencias significativas en los niveles de colesterol -libre, total y EC- al disminuirlos en un 17, 40 y 38% respectivamente. Estos resultados indicarían que el AE Oa es un buen candidato para reducir los depósitos de colesterol presentes en esta línea celular.

4.4 Efecto de los AEs sobre los niveles de TAG en células espumosas

Por otra parte, se evaluaron los niveles de TAG sobre células espumosas THP-1 luego de los tratamientos efectuados con los diferentes AEs en una concentración correspondiente a sus IC30 (Figura 4.5).

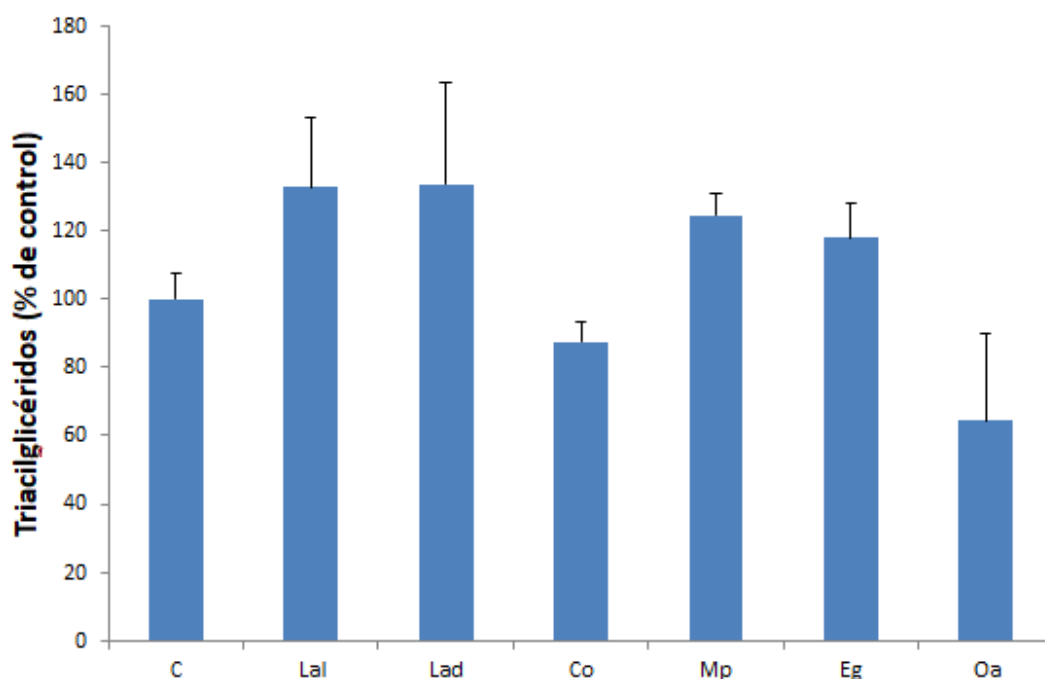


Figura 4.5: Efecto de los AEs sobre el contenido de TAG presente en células espumosas THP-1. Los datos se encuentran expresados como el promedio \pm SEM (n=3-8). *p<0.05. LaL: *Lippia alba linalool*; LaD: *Lippia alba dihidrocarvona*; Co: *Calamintha officinalis*; Mp: *Mentha piperita*; Eg: *Eucalyptus globulus*; Oa: *Origanum x applii*.

A partir de los resultados, fue posible determinar que la mayoría de los AEs tienden a aumentar los niveles de TAG en las células espumosas luego de los tratamientos. Los AEs que muestran disminuir los niveles de TAG son Co y Oa en un 13 y 36%

respectivamente. Si bien estos resultados no mostraron una reducción estadísticamente significativa, la tendencia observada podría demostrarse realizando un nuevo ensayo que incremente el número de muestras (mayor n).

4.5 Efecto de los AEs sobre el contenido lipídico

Las células espumosas se tiñeron con el colorante liposoluble Oil Red O luego de ser tratadas con los AEs durante 24 horas en concentraciones correspondientes a su IC30.

Se observó que los AEs LaL, Mp y Eg provocan un aumento significativo en la incorporación del colorante con respecto al control y que ningún AE la disminuye de manera estadísticamente significativa (figura 4.6).

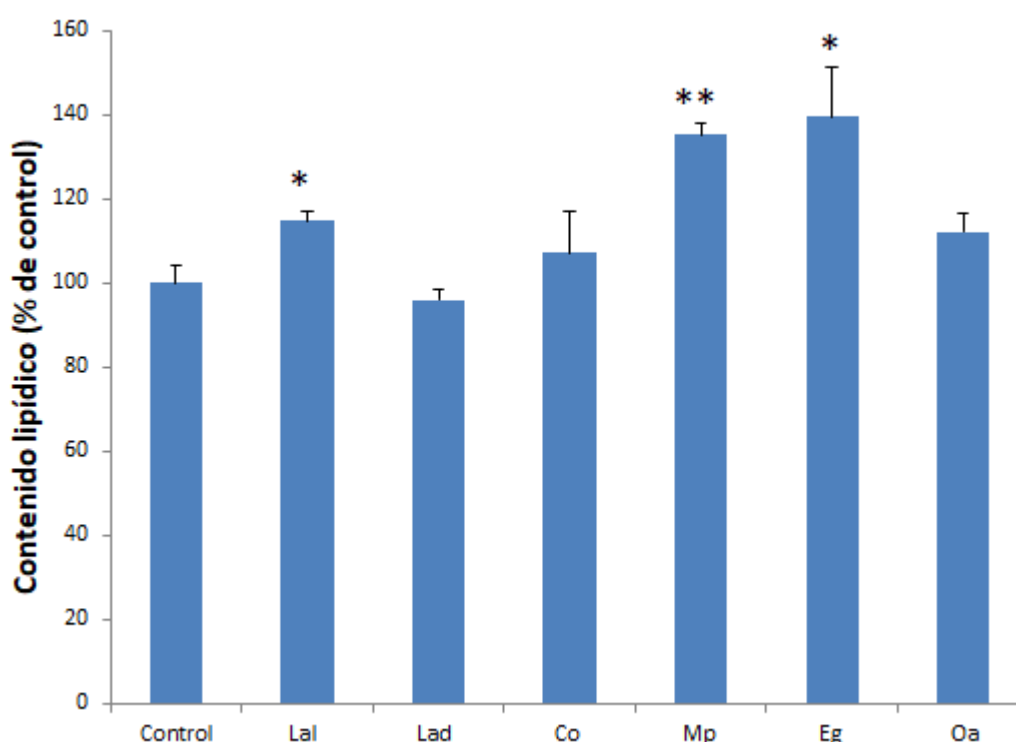


Figura 4.6: Contenido lipídico en células espumosas THP-1 expresado como porcentaje de control luego del tratamiento con los AEs. Los datos se encuentran expresados como el promedio \pm SEM (n=4-8). *p<0.05; **p<0.01. LaL: *Lippia alba linalool*; LaD: *Lippia alba dihidrocarvona*; Co: *Calamintha officinalis*; Mp: *Mentha piperita*; Eg: *Eucalyptus globulus*; Oa: *Origanum x apalii*.

El colorante Oil Red O tiñe mayoritariamente lípidos neutros como los TAG; sin embargo, puede teñir también otros componentes liposolubles como podrían ser depósitos de AE o bien los lípidos del sistema de endomembranas involucrados en los procesos de detoxificación celular. Asimismo, un incremento en el número de gotas lipídicas de pequeño tamaño en células tratadas con *Lippia alba tagetenona* ha sido reportado previamente en nuestro laboratorio (Montero-Villegas et al., 2017)(Montero-Villegas et al., 2018), implicando un aumento en la relación lípidos de membrana/TAG.

Esto podría explicar por qué el incremento en los valores de Oil Red O no se correlaciona con la disminución de los niveles de TAG observados en Co y Oa.

4.6 Efecto de los AEs sobre la peroxidación lipídica en LDL nativas

Se midió la peroxidación lipídica mediante la cuantificación de TBARS producidos en LDL nativas preincubadas con diferentes concentraciones de AEs que inhiben la viabilidad celular en las células THP-1 (IC25, IC50 e IC75) (Tabla 4.2), y posteriormente oxidadas con CuSO₄ (5 mM). Los resultados se expresaron como picomoles de TBARS/μg proteína presentes en las muestras (Figura 4.7).

Tabla 4.2: Valores de inhibición de la viabilidad del 25% (IC25), 50% (IC50) y 75% (IC75) en células espumosas THP-1 tratadas con los AEs.

	LaL	Co	Eg	Oa
IC25 (μl/L)	185	19	378	10
IC50 (μl/L)	339	130	770	45
IC75 (μl/L)	503	250	1200	84

Los valores fueron determinados mediante ensayos de MTT. LaL: *Lippia alba linalool*; Co: *Calamintha officinalis*; Eg: *Eucalyptus globulus*; Oa: *Origanum x applii*.

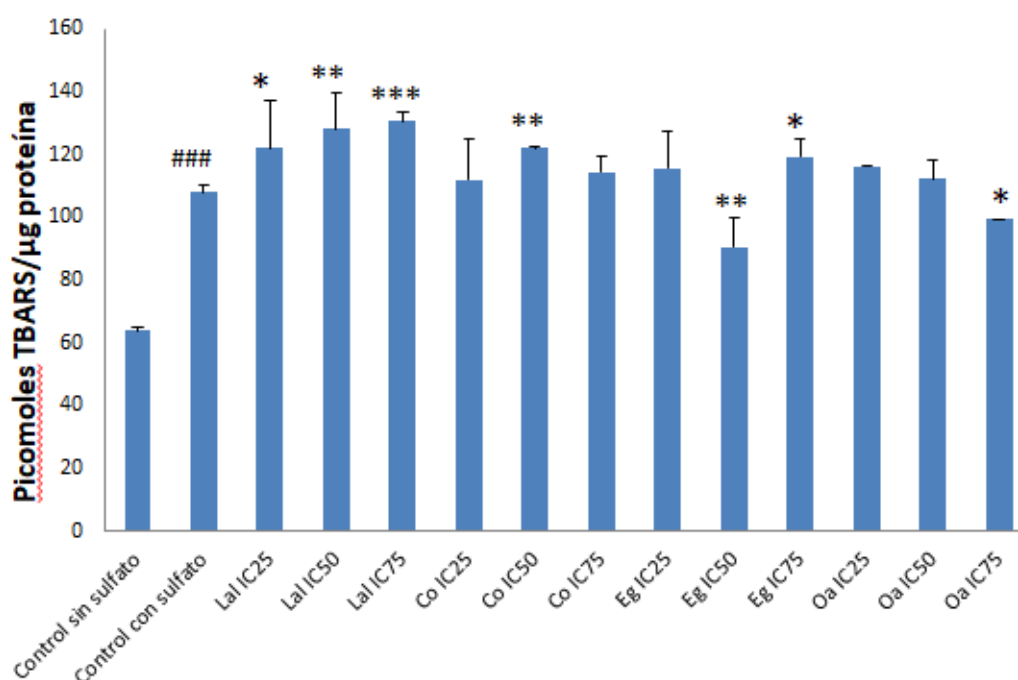


Figura 4.7: Efecto de los AEs sobre la peroxidación lipídica en LDL determinado por TBARS. Los datos se encuentran expresados como el promedio ±SEM (n=3-12). *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 con respecto al control con CuSO₄. ###p<0.001 con respecto al control sin CuSO₄. LaL: *Lippia alba linalool*; LaD: *Lippia alba dihidrocarvona*; Co: *Calamintha officinalis*; Mp: *Mentha piperita*; Eg: *Eucalyptus globulus*; Oa: *Origanum x applii*.

A partir de los resultados obtenidos y representados en la figura VII, es posible determinar en primer lugar, una diferencia significativa en los niveles de oxidación de

los lípidos de las LDL nativas incubadas con y sin CuSO_4 , con lo cual se valida el efecto oxidante del CuSO_4 en el sistema estudiado.

El tratamiento con el AE LaL, en todas las concentraciones evaluadas, produjo un aumento significativo de la peroxidación lipídica en LDL coincubadas con CuSO_4 , demostrando a su vez un incremento de la peroxidación dosis-dependiente.

El tratamiento con el AE Co presentó un incremento significativo en los niveles de oxidación de los compuestos lipídicos de las LDL sólo con la concentración de su IC_{50} .

Los AEs de LaL y Co se podrían entonces caracterizar como pro-oxidantes a estas concentraciones.

Por otra parte, el AE Eg presentó un efecto dual: a una concentración equivalente a su IC_{50} generó una disminución significativa en los niveles de peroxidación lipídica de las LDL, mientras que en la concentración correspondiente a su IC_{75} produjo un aumento significativo en los niveles de oxidación de los lípidos de dichas lipoproteínas.

Por último, el AE Oa presentó una reducción dosis dependiente en los niveles de peroxidación lipídica en las LDL, siendo estadísticamente significativa a la concentración de su IC_{75} . En base a los resultados obtenidos, es posible sugerir que en esta concentración el AE Oa posee propiedades antioxidantes.

4.7 Caracterización de los AEs

Se seleccionaron los AEs Oa, LaL, Co y Eg y se caracterizaron mediante CGC-MS como se detalló en la sección de Materiales y Métodos. La Figura 4.8 muestra los perfiles obtenidos para cada AE.

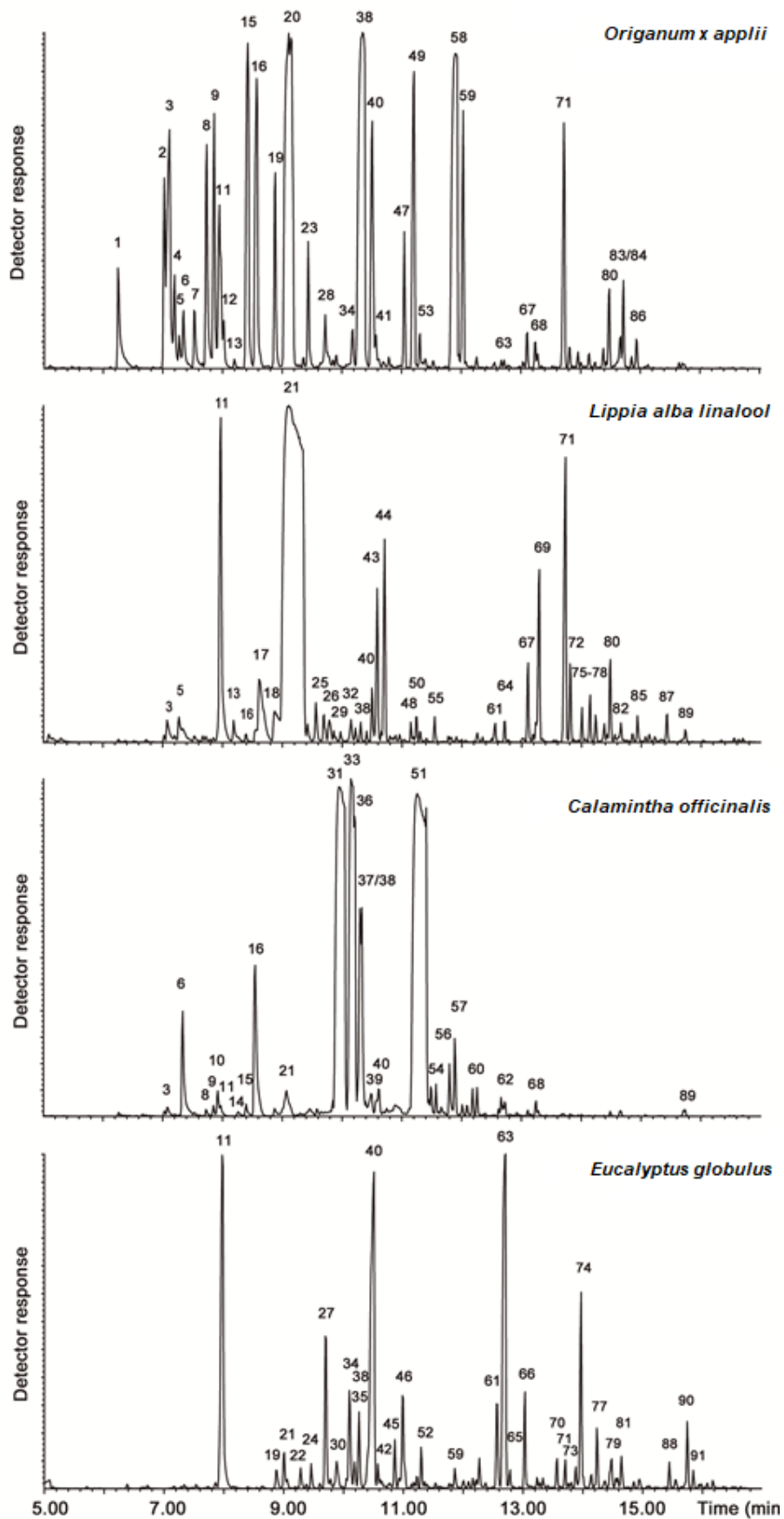


Figura 4.8: Perfil de los AEs *Origanum x apalii*, *Lippia alba linalool*, *Calamintha officinalis* y *Eucalyptus globulus*.

Tabla 4.3: Composición porcentual compuestos volátiles de aceites esenciales de *Lippia alba linalool* (LaL), *Calamintha officinalis* (Co), *Eucalyptus globulus* (Eg) y *Origanum x applii* (Oa) identificados por CGC-MS.

N° pico	Componentes seleccionados en PLS	Compuesto	IK	Composición (%)			
				LaL	Co	Eg	Oa
1		alpha-Pinene	930	-	-	-	1,85
2		Sabinene	977	-	-	-	2,53
3	C1	1-Octen-3-ol	980	0,61	0,24	-	5,12
4		n-Octanone-3	988	-	-	-	1,23
5		beta-Myrcene	992	0,57	-	-	0,35
6		3-Octanol	996	-	2,43	-	0,79
7		alpha-Phellandrene	1008	-	-	-	0,89
8	C2	alpha-Terpinene	1021	-	0,14	-	3,07
9	C3	Cymene	1029	-	0,16	-	3,06
10		p-Menth-8-en-1-ol, acetate	1033	-	0,39	-	-
11	C4	Eucaliptol	1036	7,94	0,27	16,48	2,73
12		beta-trans-Ocimene	1039	-	-	-	0,58
13	C5	beta-cis-Ocimene	1050	0,60	-	-	0,11
14		2-Cyclopenten-1-one, 3-ethyl-2-hydroxy-	1055	-	0,12	-	-
15	C7	gamma-Terpinene	1063	-	0,27	-	5,87
16	C8	cis-Sabinene hydrate	1074	0,22	4,21	-	5,31
17	C6	cis-Linalool Oxide	1077	3,24	-	-	-
18		trans-Linalool Oxide	1093	1,63	-	-	-
19	C9	Terpinolene	1094	-	-	0,75	2,35
20	C11	beta-cis-Terpineol + trans-Sabinene hydrate	1109	-	-	-	16,54
21	C10	Linalool	1109	58,43	1,25	1,40	-
22		Fenchol, exo-	1120	-	-	0,65	-
23		2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis-	1130	-	-	-	1,34
24		alpha-Campholenal	1132	-	-	0,68	-
25		(3E,5E)-2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene	1139	0,74	-	-	-
26		trans-3-Hexenyl Butyrate	1147	0,56	-	-	-
27	C17	L-trans-Pinocarveol	1148	-	-	5,14	-
28		2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-	1149	-	-	-	0,91
29		trans-2-Hexenyl Butyrate	1154	0,52	-	-	-
30		1,5,7-Octatrien-3-ol, 2,6-dimethyl	1160	-	-	1,27	-
31	C12	Menthone	1165	-	26,59	-	-
32		delta-Terpineol	1178	0,42	-	-	-
33	C13	Isomenthone	1178	-	11,71	-	-
34	C18	Borneol	1180	-	-	3,80	0,57
35		Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)	1180	-	-	0,81	-
36	C14	Isomenthol	1182	-	4,61	-	-
37	C20	trans-Isopulegone	1188	-	3,16	-	-
38	C15	Terpinen-4-ol	1188	0,28	2,41	2,16	13,92
39		L-(-)-Menthol	1200	-	0,64	-	-
36	C14	Isomenthol	1182	-	4,61	-	-
37	C20	trans-Isopulegone	1188	-	3,16	-	-
38	C15	Terpinen-4-ol	1188	0,28	2,41	2,16	13,92
39		L-(-)-Menthol	1200	-	0,64	-	-
40	C16	alpha-Terpineol	1201	0,80	0,75	21,04	3,92
41		p-Menth-8-en-2-one	1206	-	-	-	0,31
42		Myrtenol	1206	-	-	0,57	-
43		Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans	1207	2,64	-	-	-
44	C21	trans-Dihydro carvone	1216	3,25	-	-	-
45		p-Mentha-6,8-dien-2-ol, cis-	1226	-	-	1,31	-

N° pico	Componentes seleccionados en PLS	Compuesto	IK	Composición (%)			
				LaL	Co	Eg	Oa
46	C22	cis-Isocarveol	1236	-	-	3,47	-
47		Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-	1240	-	-	-	1,29
48		beta-Citral	1247	0,23	-	-	-
49	C23	Isothymol methyl ether	1251	-	-	-	4,46
50		Carvol	1253	0,39	-	-	-
51	C28	Pulegone	1255	-	37,22	-	-
52		Nerol	1258	-	-	1,03	-
53		Linalyl anthranilate + Linalyl acetate	1258	-	-	-	0,37
54		1-Acetoxy-p-menth-3-one	1271	-	0,49	-	-
55		alpha-Citral	1275	0,35	-	-	-
56		Isopulegyl acetate<neo->	1293	-	0,78	-	-
57		1-Cyclohexanone, 2-methyl-2-(3-methyl-2-oxobutyl)	1299	-	1,15	-	-
58	C24	Thymol	1300	-	-	-	11,32
59	C25	Carvacrol	1310	-	-	0,56	2,89
60		Isopulegol acetate	1321	-	0,36	-	-
61	C26	exo-2-Hydroxycineole acetate	1349	0,31	-	2,98	-
62		alpha-Terpinyl acetate	1357	-	0,29	-	-
63	C27	alpha-Terpineol acetate	1360	-	-	18,31	0,09
64		alpha-Cubebene	1361	0,32	-	-	-
65		Nerol acetate	1366	-	-	0,51	-
66		Geraniol acetate	1385	-	-	2,46	-
67		alpha-Copaene	1390	1,20	-	-	0,38
68		beta-Bourbonene	1400	-	0,19	-	0,31
69	C29	beta-Elemene	1404	3,24	-	-	-
70		alpha-Gurjunene	1426	-	-	0,81	-
71	C30	beta-Caryophyllene	1439	5,71	-	0,71	3,13
72		gamma-Elemene	1446	1,18	-	-	-
73		beta-Gurjunene	1451	-	-	0,6	-
74	C31	Aromadendrene	1458	-	-	5,83	-
75		beta-Farnesene	1461	0,42	-	-	-
76		alpha-Caryophyllene	1472	0,71	-	-	-
77	C32	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-	1479	0,40	-	1,66	-
78		gamma-Murolene	1491	0,32	-	-	-
79		Butanoic acid, 3-methyl-, 2-phenylethyl ester	1498	-	-	1,21	-
80	C33	Germacrene D	1498	1,28	-	-	0,85
81		Viridiflorene	1512	-	-	0,87	-
82		alpha-Murolene	1513	0,38	-	-	-
83		Bicyclogermacrene	1514	-	-	-	0,41
84		beta-Bisabolene	1518	-	-	-	0,84
85		Cadina-1(10),4-diene	1536	0,40	-	-	0,00
86		delta-Cadinene	1537	-	-	-	0,31
87		Germacrene B	1577	0,45	-	-	-
88		Epiglobulol	1579	-	-	0,64	-
89	C34	Caryophyllene oxide	1603	0,27	0,17	-	-
90		Globulol	1604	-	-	1,86	-
91		Viridiflorol	1613	-	-	0,43	-

4.8 Análisis de regresión de los mínimos cuadrados parciales (PLS)

El análisis estadístico PLS se utilizó para encontrar las relaciones fundamentales entre dos grupos de datos: componentes de los AEs y actividades biológicas (metabolismo lipídico, viabilidad celular y actividad antioxidante). Este análisis se basa en el desarrollo de modelos predictivos, que en este caso se utilizaron para postular los compuestos de los AEs que estarían más asociados a las actividades biológicas evaluadas.

Del total de los componentes identificados en los AEs se seleccionaron 34 de ellos (C1-C34 en Tabla 4.3). Se eligieron aquellos componentes que se encontraron en dos o más AEs y aquellos con un área mayor o igual al 3%.

Los gráficos que se obtuvieron a partir del análisis estadístico (Figuras 4.9, 4.10 y 4.11) muestran la relación entre ambos grupos de datos. La ubicación sobre la componente 1 ó 2 del gráfico, de los compuestos de los AEs en relación a la ubicación de la actividad biológica, es un indicador de la correlación que existe entre ambos. Cuanto mayor es la proximidad sobre el componente que corresponda, entre un compuesto y la actividad biológica, significa que hay una relación más positiva entre ambos parámetros (compuesto y actividad biológica). De manera inversa, cuanto mayor es la distancia entre ambos parámetros, la relación es más negativa.

Una ubicación en el medio de la gráfica indica correlación muy baja o nula entre los compuestos del AE y la actividad biológica.

Compuestos que afectan la viabilidad celular

Se observó al evaluar la viabilidad celular en el componente 1 que el compuesto más cercano, y por ende el que se relaciona más positivamente es el C31, y el más lejano y que se relaciona más negativamente es el C8 (Figura 4.9). Estos compuestos corresponden al aromadendreno y al cis-sabineno hidrato respectivamente. Con los resultados obtenidos se podría caracterizar al cis-sabineno hidrato (componente de los AEs Co y Oa) como un potencial efector en la disminución de la viabilidad celular, mientras que el aromadendreno (componente del AE Eg), al correlacionarse positivamente con la viabilidad celular, sugiere que no es un compuesto que afecte significativamente esta variable.

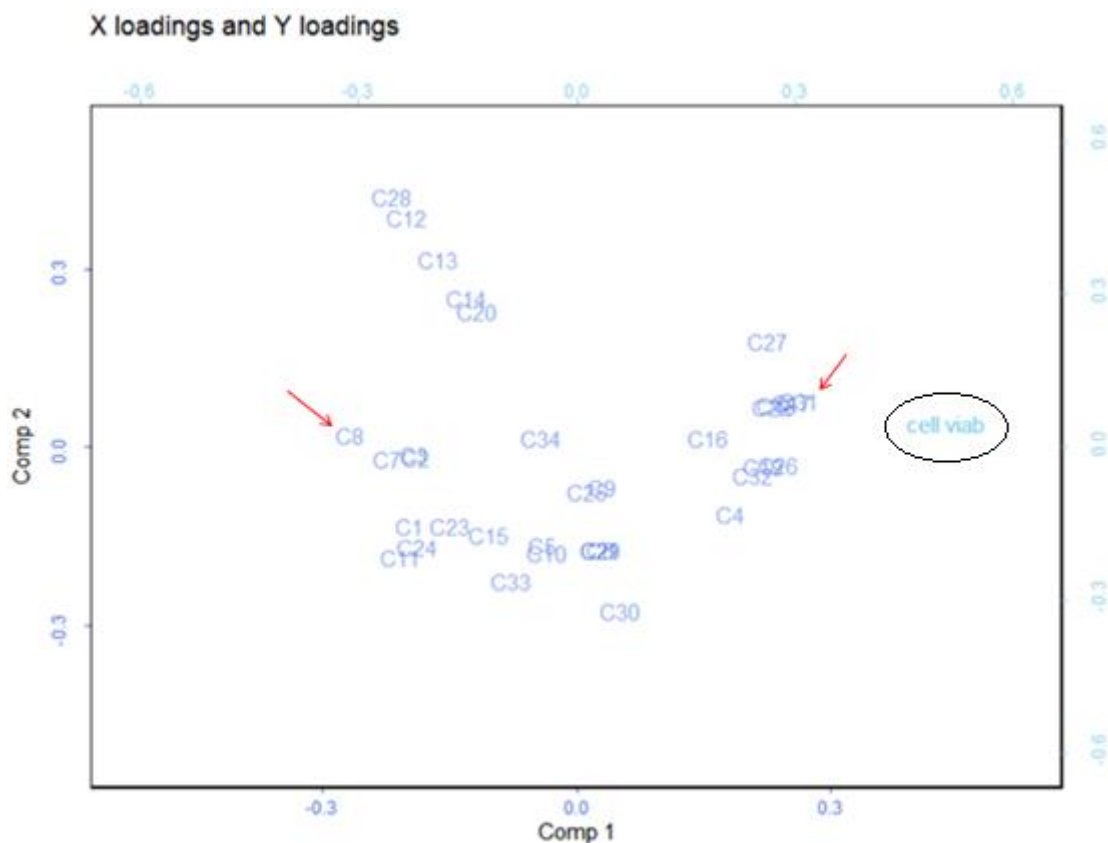


Figura 4.9: Relación entre los componentes de los AEs y la viabilidad celular evaluada por PLS. Con un círculo se indica la actividad biológica evaluada y con flechas rojas los componentes considerados relevantes. La identidad de los compuestos C1-C34 se encuentran detalladas en la Tabla 4.3).

Compuestos que afectan el contenido lipídico celular

Al evaluar los lípidos totales demostraron no ajustarse bien con este modelo (gráfico no mostrado) por lo que no se consideró en el análisis. El resto de los parámetros (TAG, EC, colesterol total y colesterol libre) en cambio presentaron buenos índices de ajuste y al ser evaluados en el gráfico de loadings (Figura 4.10), se observó que los mismos se encuentran muy relacionados entre sí y correlacionados positivamente con el C10, mientras que con el C11 lo hacen muy negativamente. El C10 corresponde al linalool, mientras que el C11 es una mezcla de trans-sabineno hidrato y cis- β -terpineol. Estos resultados sugieren al linalool (componente mayoritario del AE LaL) como el potencial terpeno involucrado en el incremento de los depósitos lipídicos y a los compuestos trans-sabineno hidrato y cis- β -terpineol (componente del AE Oa) como los terpenos que generarían una disminución en el contenido lipídico celular.

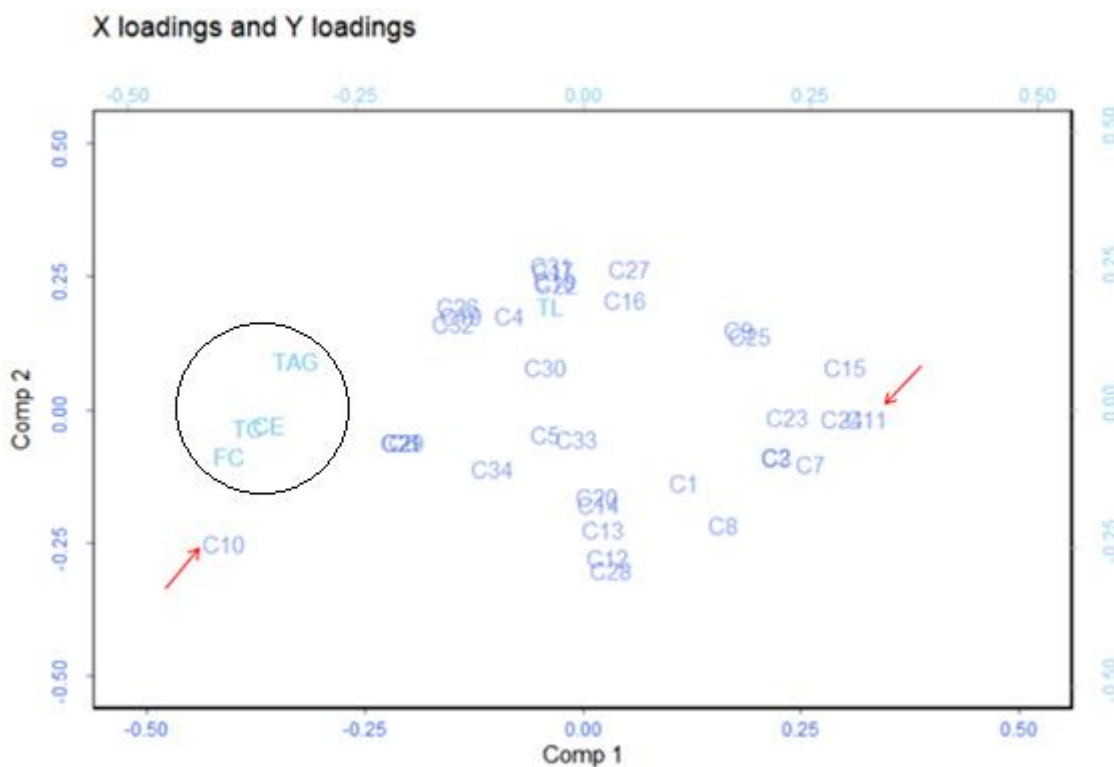


Figura 4.10: Relación entre los componentes de los AEs y el metabolismo lipídico evaluada por PLS. Con un círculo negro se indican las actividades biológicas evaluadas y con flechas rojas los componentes considerados relevantes. TAG: triacilglicéridos. CE: ésteres de colesterol. FC: colesterol libre. TC: colesterol total. TL: lípidos totales. La identidad de los compuestos C1-C34 se encuentran detalladas en la Tabla 4.3).

Compuestos que afectan la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica evaluada con el IC25 no se ajustó bien al modelo (dato no mostrado) y por ende no se consideró en el análisis. Al evaluar LLP(IC50) en el componente 1 se observó que el C10 (linalool) fue el compuesto que se relacionó más positivamente y el C27 (α -terpineol acetato) más negativamente. LLP(IC75) se evaluó en el componente 2 y se obtuvo una vez más al C10 como el componente más cercano mientras que el más lejano es el C11 (trans-sabineno hidrato+cis- β -terpineol) (Figura 4.11).

Estos resultados indicarían que los componentes que tienen mayor efecto antioxidante son el hidrato de trans-sabineno hidrato, cis- β -terpineol y α -terpineol acetato, que constituyen componentes mayoritarios de los AEs de Oa y Eg respectivamente. El compuesto con mayor efecto prooxidante sería el linalool, correspondiente al AE LaL.

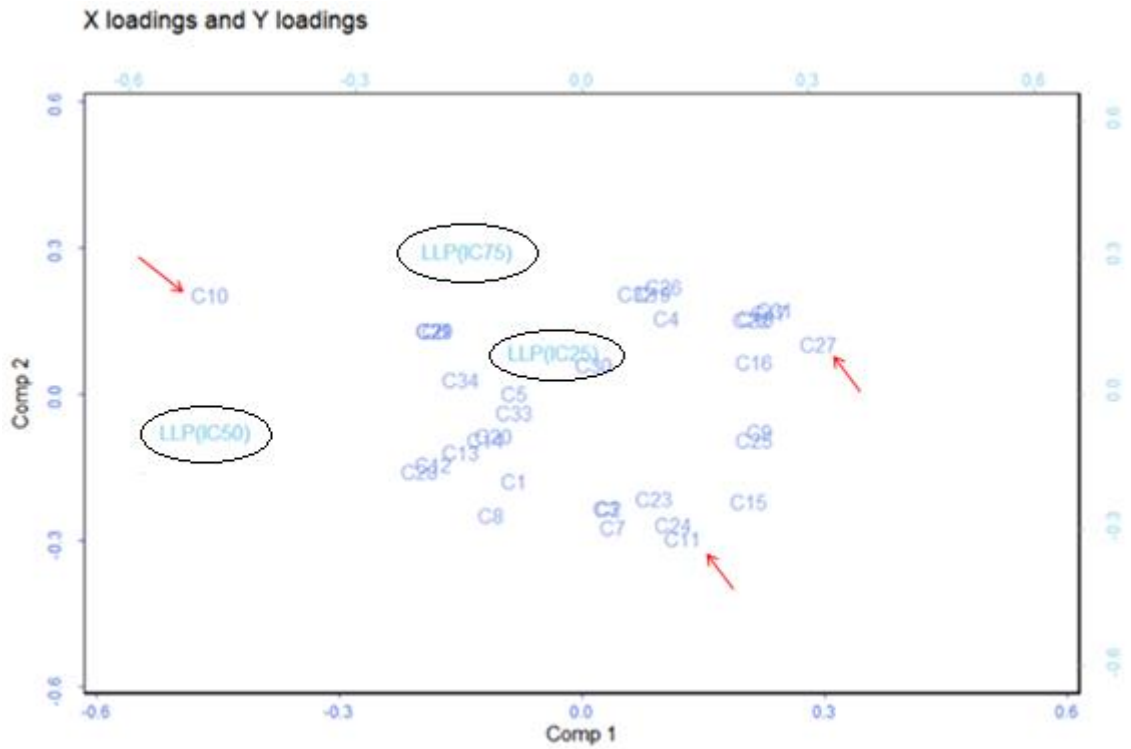


Figura 4.11: Relación entre los componentes de los AEs y la actividad antioxidante evaluada en PLS. Con círculos negros se indican las actividades biológicas evaluadas y con flechas rojas los componentes considerados relevantes. LLP: peroxidación lipídica evaluada sobre las LDL tratadas con las concentraciones de IC25 (LLPIC25), IC50 (LLPIC50) e IC75 (LLPIC75). La identidad de los compuestos C1-C34 se encuentran detalladas en la Tabla 4.3).



DISCUSIÓN

La aterosclerosis es una ECV progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos, tales como colesterol y TAG, y elementos fibrosos en las arterias (Lu & Daugherty, 2015). Existen fármacos que se utilizan para la prevención de esta enfermedad debido a su capacidad para disminuir el colesterol plasmático. Las estatinas son, en la actualidad, los fármacos con resultados positivos más utilizados. Si bien su dosificación reduce los niveles de colesterol, aparecen efectos secundarios no deseables tales como oculares, musculares e intestinales (Djulgovic & Hozo, 2019).

Las plantas medicinales y aromáticas constituyen recursos naturales de gran importancia para el tratamiento de diversas enfermedades. Es por este motivo que surge el creciente interés en conocer y evaluar las propiedades de las sustancias obtenidas a partir de las distintas fuentes naturales, con el objetivo de que puedan ser utilizadas por la industria farmacéutica (A. C. De Groot & Schmidt, 2016a). Los AEs son sustancias que se obtienen a partir de plantas aromáticas o frutos, y según estudios previos pueden presentar actividad antioxidante e hipolipogénica (Plant et al., 2019).

Basados en esta información nos propusimos como objetivo de esta investigación encontrar AEs de la región con potencial farmacológico para el tratamiento o prevención de la aterosclerosis. Según los objetivos específicos planteados, se realizaron los siguientes análisis:

1- Identificación de los AEs capaces de inhibir la viabilidad celular de las células espumosas

La presencia de células espumosas, formadas a partir de la captación de lípidos por parte de los macrófagos, determina el inicio del desarrollo de la aterosclerosis, ya que la acumulación de las mismas lleva a un aumento en el tamaño de la placa de ateroma. Por lo tanto, puede considerarse que inhibir la viabilidad celular de las células espumosas sería un enfoque interesante para el tratamiento de la aterosclerosis (Lu & Daugherty, 2015).

Para evaluar la capacidad de los AEs sobre este factor se realizó un análisis de viabilidad celular de células espumosas THP-1 (de origen humano), un modelo celular ampliamente utilizado en estudios sobre esta enfermedad dada la capacidad del mismo para estimar los efectos inmunomoduladores de compuestos tanto en condiciones activadas como en células en reposo (Chanput et al., 2014). El uso de células THP-1 nos brinda una visión aproximada de la respuesta que podrían desencadenar los AEs sobre las mismas en un sistema *in vivo*. Al comparar los resultados con los distintos AEs utilizados observamos que los AEs Eg, Ma y Ro son los que menor efecto tienen sobre la inhibición de la viabilidad celular, con valores de IC50 más elevados (Tabla 4.1). Los AEs LaL, LaD y Mp presentan valores intermedios de IC50 y los de Co y Oa los más bajos, indicando una mayor influencia sobre la inhibición de la viabilidad de las células espumosas. De este análisis se evidencia que el AE Oa es el que presenta el menor valor de IC50, siendo un tercio del obtenido para el AE Co.

En base a estos resultados que demostraron que el AE Oa es el más efectivo para inhibir la viabilidad celular de las células espumosas, podemos inferir que es un potencial candidato para lograr disminuir la progresión de la aterosclerosis.

2- Identificación de los AEs con mayor potencial para disminuir los depósitos lipídicos.

Concentraciones elevadas de colesterol contribuyen al inicio y la progresión de la aterosclerosis; es por ello que encontrar un compuesto natural que influya en los niveles del mismo es de suma importancia para el tratamiento de esta enfermedad. Si bien en las células espumosas el colesterol (en forma de ésteres) es el lípido mayoritario, los TAG también están presentes en las gotas lipídicas (Zárate et al., 2016). Por lo tanto, para lograr este objetivo se evaluó el contenido lipídico (colesterol (libre, esterificado y total), TAG y lípidos totales) de las células espumosas luego del tratamiento con los AEs.

Como resultado del estudio del efecto de los AEs sobre los niveles del colesterol esterificado en células espumosas se observó que algunos no modificaron su contenido intracelular (LaD y Eg), otros lo incrementaron (LaL y Mp) y otros lo disminuyeron (Co y Oa).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Montero-Villegas et al., 2017) han demostrado que células hepáticas tratadas con AEs de quimiotipos de *L. Alba* (diferentes a los utilizados en el presente trabajo) disminuyeron la síntesis de colesterol pero no modificaron el contenido de colesterol intracelular, probablemente debido a un aumento en la captación de colesterol extracelular, lo que induciría un efecto hipolipemiante similar al producido por las estatinas.

En la línea celular de macrófagos empleada en el presente trabajo, el AE *L. alba* quimiotipo linalool mostró un incremento en los valores de colesterol intracelular. En este caso, independientemente del mecanismo de acción del AE (que no fue evaluado en este trabajo), el aumento de depósitos lipídicos en células espumosas, produciría un efecto contrario al requerido para inhibir la progresión de la aterosclerosis. Los AEs Co y Oa, por el contrario, mostraron una tendencia a reducir los niveles de colesterol celular, siendo el de Oa el único que lo hizo en forma estadísticamente significativa. No se han encontrado datos bibliográficos que reporten la capacidad del AE Oa para reducir el colesterol intracelular.

Estos resultados demuestran que los AEs tendrían mecanismos de acción diferentes de acuerdo a su composición, motivo por el cual es fundamental que se realicen nuevos estudios para comprender el efecto específico de los distintos componentes sobre estos parámetros.

Con respecto a los valores en el contenido de TAG en células espumosas luego del tratamiento con los AEs se vieron aumentados para los AEs LaL, LaD, Mp y Eg, y disminuidos para los AEs Eg y Oa. Estos últimos dos AEs son los que presentan el efecto deseado ya que la acción de los mismos podría llevar a una reducción del tamaño de las gotas lipídicas y así inhibir la progresión de la aterosclerosis. De esta manera se sugieren diversos mecanismos de acción que podrían poseer los AEs para ejercer su efecto sobre los depósitos de diferentes lípidos.

El contenido lipídico en células espumosas fue también evaluado utilizando el colorante Oil Red O, un colorante liposoluble que tiñe principalmente lípidos neutros. Se observó que ninguno de los AEs disminuyó la cantidad de colorante en las células espumosas con respecto al control. Como se mencionó anteriormente en la sección

Resultados (apartado 4.5- Efecto de los AEs sobre el contenido lipídico), especulamos que este colorante podría teñir otros componentes lipídicos además de los TAG. Según bibliografía consultada (Torous et al., 2020) se ha reportado que hay varios factores que interfieren en la interpretación de la tinción con Oil Red O y, por lo tanto, en la determinación del contenido lipídico. Por lo tanto, para nuestro sistema de trabajo (células THP-1) es necesario recurrir a metodologías más específicas y precisas al momento de evaluar el contenido lipídico.

De lo expuesto en este apartado, los resultados obtenidos al medir los niveles de colesterol y TAG nos llevan a concluir que el AE Oa dada la capacidad que demostró para disminuir los niveles lipídicos en células espumosas, posee características prometedoras para el tratamiento de la aterosclerosis.

3- Identificación de los AEs con mayor potencial antioxidante.

La aterosclerosis se inicia con una disfunción endotelial generada por estrés oxidativo, un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la acción de las defensas antioxidantes. Por este motivo, encontrar un compuesto natural con potencial antioxidante es de sumo interés para la prevención de esta enfermedad (Rosales et al., 2010). Con el fin de hallar un AE con esta propiedad, se evaluó la peroxidación de los lípidos de las LDL nativas luego del tratamiento de las mismas con los AEs y un agente inductor de estrés oxidativo.

El AE LaL ha demostrado poseer actividad prooxidante. Se ha reportado en bibliografía que AEs de *Lippia alba* presentan actividad antioxidante (Linde et al., 2016). Sin embargo, los autores indican que esta actividad está fuertemente influenciada por el quimiotipo y la composición del AE. Esto nos permite concluir que el quimiotipo estudiado en el presente trabajo no genera un efecto beneficioso para el tratamiento de la aterosclerosis como sí podrían hacerlo otros AEs de la misma especie con otros quimiotipos.

Otro AE que presentó actividad prooxidante es el de Co. Esta información es de relevancia ya que no hemos encontrado reportes bibliográficos hasta el momento sobre su actividad prooxidante o antioxidante, sólo en relación a su actividad antimicrobiana (Monforte et al., 2011). Consideramos que es una contribución valiosa para la comunidad el aporte de información científica acerca de la actividad y el potencial impacto de la acción de este AE sobre el estrés oxidativo.

En el caso del AE Eg, al evaluar el efecto del mismo sobre la peroxidación lipídica de las LDL plasmáticas, se obtuvo un comportamiento antioxidante a una concentración correspondiente al IC50 de viabilidad de las células espumosas y un comportamiento prooxidante a concentraciones mayores (IC75). Se ha reportado en bibliografía (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012) que ciertos terpenos pueden funcionar como compuestos prooxidantes a altas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones, pueden actuar como compuestos antioxidantes. Por lo tanto, los resultados obtenidos sobre el AE Eg demuestran la importancia de evaluar la actividad de los AEs a diferentes concentraciones, ya que dependiendo de las mismas, los AEs pueden resultar beneficiosos o perjudiciales para la salud.

Por otra parte, el AE Oa indicó poseer actividad antioxidante. Estos resultados son coincidentes con los reportados en datos bibliográficos (Simirgiotis et al., 2020), donde se evaluó esta propiedad de AE de *Origanum vulgare* (una especie diferente a la empleada en el presente trabajo) a través de diferentes ensayos *in vitro*.

Considerando lo discutido con anterioridad, los resultados expuestos y los datos bibliográficos, los ensayos abocados al objetivo planteado sugieren al AE Oa como el mejor candidato para la prevención o tratamiento de la aterosclerosis.

4- Identificación de los componentes de los AEs.

Los AEs y sus componentes mayoritarios, los terpenos, han demostrado poseer una amplia gama de actividades biológicas entre ellas, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012). Las propiedades de los AEs dependen de la composición de los mismos, la cual puede variar considerablemente según la zona de cultivo, momento de cosecha e incluso la especie cultivada, como se mencionó anteriormente para el caso de *Lippia alba*. Por este motivo resulta sumamente relevante caracterizar los AEs e intentar dilucidar cuáles son los componentes involucrados en cada propiedad del mismo. Por ejemplo, algunos estudios han reportado que los terpenos nerol, carvacrol y eugenil, entre otros, debido a sus propiedades antioxidantes, brindan protección frente a condiciones de estrés oxidativo en diferentes enfermedades (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012).

Empleando modelos predictivos en los cuales es posible relacionar los componentes de los AEs con las actividades biológicas evaluadas, se determinaron correlaciones entre ambos parámetros, que pueden utilizarse para identificar potenciales agentes antiaterogénicos.

De todos los compuestos analizados, el cis-sabineno hidrato (presente en el AE Oa, Co y LaL) parece ser el responsable de inhibir la viabilidad celular de las células espumosas. Por otro lado su isómero (trans-sabineno hidrato), junto con el cis- β -terpineol, son capaces de reducir los depósitos lipídicos y otorgarle actividad antioxidante al AE Oa. Estudios sobre el monoterpeno sabineno hidrato han reportado la capacidad del mismo para prevenir la oxidación lipídica (Quiroga et al., 2014) y la hiperlipidemia (Tardugno et al., 2018), ya que análisis bioquímicos realizados en ratas diabéticas tratadas con extracto de orégano (donde el sabineno hidrato es un componente mayoritario) demostraron disminuir los niveles séricos de colesterol total, TAG y colesterol de LDL. No se ha encontrado bibliografía para confrontar sobre el cis- β -terpineol ni de la mezcla de ambos componentes.

Por el contrario, se determinó que el linalool si bien tiene gran potencial como agente antitumoral (Kladniew et al., 2014; Rodenak-Kladniew et al., 2018), no debería emplearse para el tratamiento de aterosclerosis ya que los resultados obtenidos con CGC-MS y PLS muestran a este terpeno (componente mayoritario del AE LaL) como el potencial inductor del incremento de los depósitos lipídicos en células espumosas y de la actividad prooxidante en las LDL.

En conclusión, los compuestos que cumplen con el objetivo planteado son el trans-sabineno hidrato y el cis- β -terpineol. Esta mezcla de terpenos tiene, por lo tanto, potencial farmacológico para el tratamiento de la aterosclerosis.

Conclusión final y perspectivas a futuro

Del registro y análisis de todos los resultados obtenidos en los objetivos planteados en la presente investigación, se arriba a la conclusión de que el AE Oa es un potencial candidato para la prevención y tratamiento de la aterosclerosis. Esta conclusión se fundamenta debido a la capacidad que presenta este AE para reducir la viabilidad de células espumosas y disminuir los niveles de colesterol y TAG presentes en los depósitos lipídicos de estas células, así como también debido a la actividad antioxidante que posee. Asimismo, estas últimas dos propiedades que presenta este AE pueden ser atribuidas a la mezcla de compuestos trans-sabineno hidrato y cis- β -terpineol. Dada la falta de información del efecto de esta mezcla de terpenos sobre las células espumosas e incluso del β -terpineol, sería interesante como proyecto a futuro evaluar la acción de los mismos sobre células espumosas de forma individual y en conjunto para determinar si presentan efectos independientes, aditivos o sinérgicos.

The background of the slide is filled with a repeating pattern of various chemical structures. These include alkenes, alcohols, ketones, and cyclic compounds like cyclohexanes and bicyclic systems. Some structures feature red oxygen atoms and black wedges/dashes to indicate stereochemistry. The structures are scattered across the page, creating a textured, scientific background.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados hallados y analizados a lo largo de este trabajo de investigación, se obtuvieron a las siguientes conclusiones:

- El AE Oa es el más efectivo para inhibir la viabilidad de las células espumosas.
- El AE Oa posee la capacidad de disminuir los niveles de colesterol y TAG en células espumosas.
- El AE Oa posee actividad antioxidante.
- La mezcla de terpenos trans-sabineno hidrato y cis- β -terpineol le otorgan al AE Oa la característica de reducir los depósitos lipídicos y la actividad antioxidante.
- El AE Oa es un potencial candidato para el tratamiento y la prevención de la aterosclerosis.

The background of the slide is a repeating pattern of various chemical structures. These include alkenes, alcohols, ketones, and complex polycyclic systems. Some structures feature red oxygen atoms and black wedges/dashes to indicate stereochemistry. The structures are scattered across the page, creating a textured, scientific backdrop.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, J. M., Faustino, C., García, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2016). R.O 15.pdf. *Future Science*, 4.
- Armeliuș, E. K. E., Erdberg, P., Henningsson, M., Bengt-a, E. S., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, A., Case, B., & Case, B. (2001). *Model building and multivariate projection to person lity test d t*.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Beller, M., Thiel, K., Thul, P. J., & Jäckle, H. (2010). Lipid droplets : A dynamic organelle moves into focus. *FEBS Letters*, 584(11), 2176–2182. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.022>
- Bianchetti, G., Di Giacinto, F., De Spirito, M., & Maulucci, G. (2020). Machine-learning assisted confocal imaging of intracellular sites of triglycerides and cholesteryl esters formation and storage. *Analytica Chimica Acta*, 1121, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.076>
- Campos Aldrete, M. E. (2010). Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas: Editorial. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(3), 5.
- Cermelli, C., Fabio, A., Fabio, G., & Quaglio, P. (2008). Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Current Microbiology*, 56(1), 89–92. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9045-0>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chen, L., Chen, X. W., Huang, X., Song, B. L., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease. *Science China Life Sciences*, 62(11), 1420–1458. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1563-3>
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., & Orekhov, A. N. (2016). Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(1), 17–28. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12689>
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2017). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 95(11), 1153–1165. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1575-8>
- De Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016a). Essential Oils, Part I: Introduction. *Dermatitis*, 27(2), 39–42. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000175>
- De Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016b). Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Dermatitis*, 27(4), 161–169. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000193>
- De Groot, A., & Schmidt, E. (2016). Essential Oils, Part V: Peppermint Oil, Lavender Oil, and Lemongrass Oil. *Dermatitis*, 27(6), 325–332. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000218>
- Dhakad, A. K., Pandey, V. V., Beg, S., Rawat, J. M., & Singh, A. (2018). Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. *Journal of the Science*

- of Food and Agriculture*, 98(3), 833–848. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8600>
- Djulgovic, B., & Hozo, I. (2019). Statins for primary prevention of cardiovascular disease. *Annals of Internal Medicine*, 171(1), 73–74. <https://doi.org/10.7326/L19-0261>
- Förstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). *Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. 713–736. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>
- Gonzalez-Burgos, E., & Gomez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(31), 5319–5341. <https://doi.org/10.2174/092986712803833335>
- Guo, S., Lu, J., Zhuo, Y., Xiao, M., Xue, X., Zhong, S., Shen, X., Yin, C., Li, L., Chen, Q., Zhu, M., Chen, B., Zhao, M., Zheng, L., Tao, Y., & Yin, H. (2019). Endogenous cholesterol ester hydroperoxides modulate cholesterol levels and inhibit cholesterol uptake in hepatocytes and macrophages. *Redox Biology*, 21(November 2018), 101069. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101069>
- Kataoka, H. (2015). SPME techniques for biomedical analysis. *Bioanalysis*, 7(17), 2135–2144. <https://doi.org/10.4155/bio.15.145>
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11). <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
- Khosravi, M., Poursaleh, A., Ghasempour, G., Farhad, S., & Najafi, M. (2019). The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biological Chemistry*, 400(6), 711–732. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0397>
- Kladniew, R., Emilio, B., Polo, M. P., Montero Villegas, S., Galle, M. E., Crespo, R., & Garcia, M. M. (2014). *Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1, 8-cineole, and simvastatin on human cell lines*.
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., & Gazim, Z. C. (2016). Quimiotipos, extração, composição e uso do óleo essencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 191–200. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037
- Lowry, R. R. (1968). Ferric chloride spray detector for cholesterol and cholesteryl esters on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research*, 9(3), 397.
- Lu, H., & Daugherty, A. (2015). Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(3), 485–491. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305380>
- Monforte, M. T., Tzakou, O., Nostro, A., & Zimbalatti, V. (2011). *Pharmaco-Biological Department, School of Pharmacy, University of Messina, Messina, Italy; and 2 Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece*. 14(3), 297–303.
- Montero-Villegas, S., Crespo, R., Rodenak-Kladniew, B., Castro, M. A., Galle, M., Ciccio, J. F., García de Bravo, M., & Polo, M. (2018). Cytotoxic effects of essential oils from four *Lippia alba* chemotypes in human liver and lung cancer cell lines. *Journal of Essential Oil Research*, 30(3), 167–181.
- Montero-Villegas, S., Polo, M., Galle, M., Rodenak-Kladniew, B., Castro, M., Ves-Losada, A.,

- Crespo, R., & García de Bravo, M. (2017). Inhibition of Mevalonate Pathway and Synthesis of the Storage Lipids in Human Liver-Derived and Non-liver Cell Lines by Lippia alba Essential Oils. *Lipids*, 52(1), 37–49. <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4218-x>
- Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q., & Chen, C. (2005). Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 98(12), 845–856. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hci136>
- Oliveira, J. R. De, Esteves, S., & Camargo, A. (2019). Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science*, 8, 1–22.
- Plant, R. M., Dinh, L., Argo, S., & Shah, M. (2019). The Essentials of Essential Oils. *Advances in Pediatrics*, 66, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.03.005>
- Quiroga, P. R., Asensio, C. M., & Nepote, V. (2014). Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 471–479. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6744>
- Rodenak-Kladniew, B., Castro, A., Stärkel, P., De Saeger, C., de Bravo, M. G., & Crespo, R. (2018). Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways. *Life Sciences*, 199, 48–59.
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717–1727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>
- Rosales, A. J., García, V. D., & Chávez, A. A. (2010). El papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial de la aterosclerosis. *CIENCIA Ergo-Sum*, 17(3), 258–268. <http://cienciaergosum.uaemex.mx/index.php/ergosum/article/view/1056>
- Sierra, C. H., Portilla, E. C., & Muñoz, W. (2015). Mecanismos celulares y moleculares de la aterotrombosis Cellular and molecular mechanisms of atherothrombosis. *Rev Colomb Cardiol*, 21(1), 35–43.
- Simirgiotis, M. J., Burton, D., Parra, F., López, J., Muñoz, P., Escobar, H., & Parra, C. (2020). Antioxidant and antibacterial capacities of origanum vulgare l. Essential oil from the arid andean region of chile and its chemical characterization by gc-ms. *Metabolites*, 10(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/metabo10100414>
- Tabas, I., & Bornfeldt, K. E. (2016). Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 653–667. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306256>
- Tardugno, R., Pellati, F., Iseppi, R., Bondi, M., Bruzzesi, G., & Benvenuti, S. (2018). Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. *Natural Product Research*, 32(5), 544–551. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1329730>
- Torous, V. F., Brackett, D., Brown, P., Edwin, N., Heidarian, A., Lobocono, C., Sun, T., Pitman, M. B., & Ly, A. (2020). Oil red O staining for lipid-laden macrophage index of bronchoalveolar lavage: interobserver agreement and challenges to interpretation. *Journal of the*

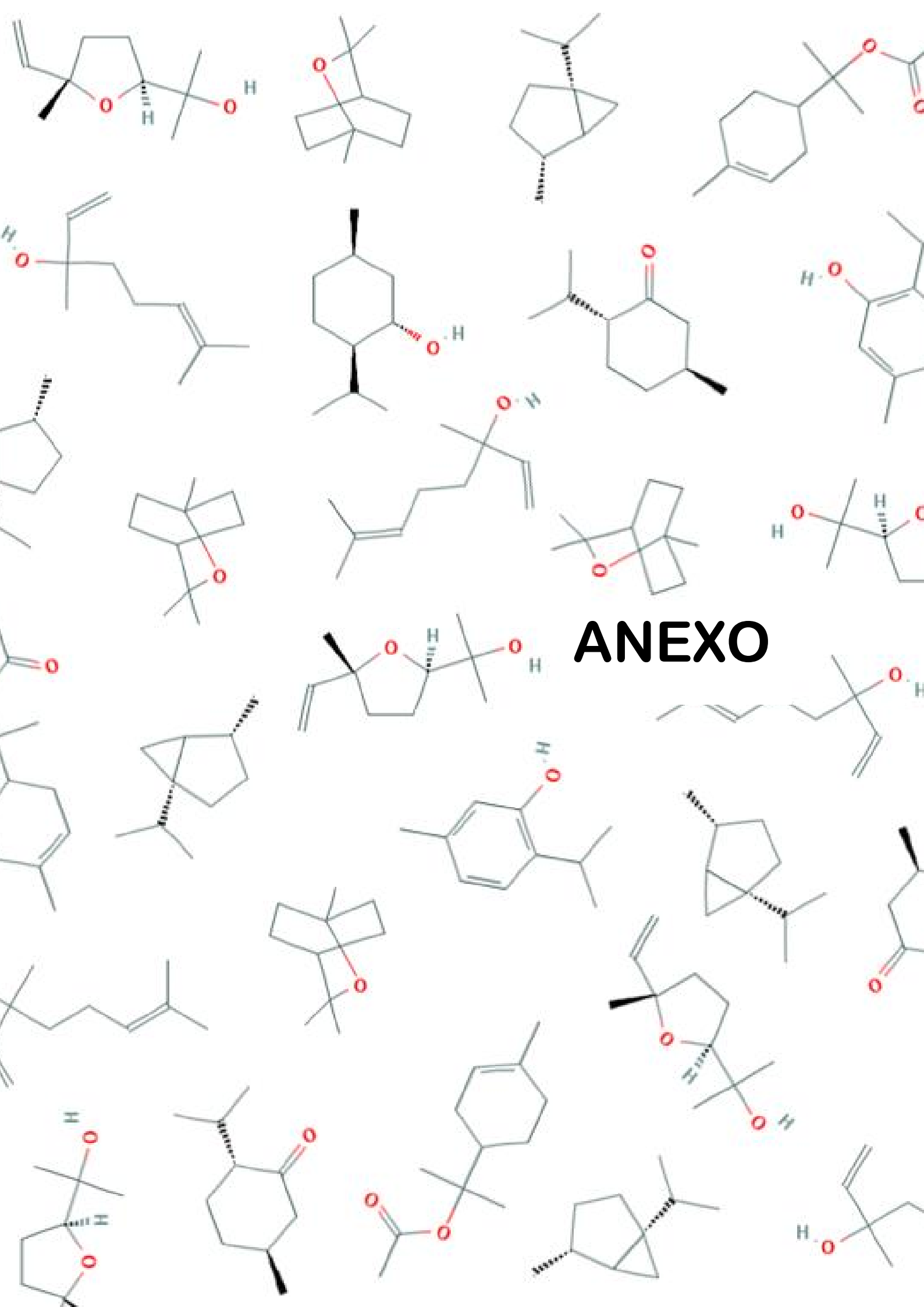
American Society of Cytopathology, 9(6), 563–569.
<https://doi.org/10.1016/j.jasc.2020.05.010>

Torres, N., Guevara-Cruz, M., Velázquez-Villegas, L. A., & Tovar, A. R. (2015). Nutrition and Atherosclerosis. *Archives of Medical Research*, 46(5), 408–426.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.010>

van der Velde, A. E. (2010). Reverse cholesterol transport: From classical view to new insights. *World Journal of Gastroenterology*, 16(47), 5908–5915.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i47.5908>

Zárate, A., Manuel-Apolinar, L., Basurto, L., De la Chesnaye, E., & Saldívar, I. (2016). Cholesterol and atherosclerosis. Historical considerations and treatment. *Archivos de Cardiología de Mexico*, 86(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2015.12.002>

<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>



ANEXO

Preparación del medio de cultivo RPMI

Se pesaron 10.5 gr del polvo del medio RPMI, éste se colocó en una probeta junto con 400 ml de agua bidestilada y se agitó durante una hora. Luego, se agregaron 2 gr de bicarbonato de sodio, 0.1 gr de estreptomina y 4 gr de HEPES. Después de agitar por 20 minutos se agregó agua bidestilada hasta llegar a un volumen de 950 ml y se llevó a pH 6,9. Finalmente, se completó con agua bidestilada hasta volumen final (1 litro). Por último, se filtró el medio de cultivo utilizando un filtro 0.2 µm en flujo laminar para conservar la condición de esterilidad.

El medio de cultivo RPMI se obtuvo de Serenpidia Lab.

Determinación de triacilglicéridos con el kit TG color (Wiener lab)

Reactivos:

- Estándar: solución de glicerol 2,26 mmol/l.
- Reactivo A: solución conteniendo buffer (pH 6,8), clorofenol, lipoprotein lipasa, glicerol quinasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa, adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona.

Protocolo:

Los tubos esmerilados con la sílica en cloroformo fueron centrifugados durante dos minutos. Se colectó el solvente de cada uno de ellos evitando coleccionar partículas de sílica y se trasvasaron a tubos de vidrio limpios. A los tubos esmerilados se les agregó 1.5 ml de cloroformo a cada uno para realizar una segunda extracción de los lípidos. Se vortexearon, se centrifugaron y luego se colectó nuevamente el solvente, con el mismo cuidado que en la extracción anterior. Se procedió a realizar un último lavado de la sílica con 1 ml de cloroformo repitiendo los mismos pasos. Los tubos a los cuales se trasvasó la muestra se colocaron en el equipo SpeedVac y se llevaron a seco en aproximadamente 30 minutos.

Se agregaron 200 µl del reactivo A del kit TG color a cada uno de los tubos llevados a seco con la muestra y se vortexearon de modo de disolver correctamente los TAG en el reactivo. En simultáneo se construyó una curva de calibración con el kit como que se indica en la Tabla 8.1:

	Blanco	10 µg TG	20 µg TG	40 µg TG
Estándar	-	5 µl	10 µl	20 µl
Reactivo A	200 µl	195 µl	190 µl	180 µl

Tabla 8.1: Reactivos utilizados para la determinación de triacilglicéridos con el kit TG color.

Cuantificación de proteínas mediante el ensayo de Lowry

Reactivos:

Solución A: carbonato sódico al 2% (p/v) en NaOH 0.1 M.

Solución B1: tartrato sódico-potásico al 2.7% (p/v) en agua bidestilada.

Solución B2: sulfato cúprico al 1% (p/v) en agua bidestilada.

Solución C: se preparó en el momento de su uso con 1 ml de solución B1 y 100 ml de solución A, a lo que luego se le agregó 1 ml de solución B2.

Solución D: reactivo de Folin al 50% en agua bidestilada.

Protocolo:

Se utilizó como testigo una solución madre de albúmina sérica bovina (ASB) (1 mg/ml) a partir de la cual se construyó una curva de calibración.

En tubos Khan se prepararon las mezclas como se muestra en la Tabla 8.2:

	Blanco	5 µg proteína	10 µg proteína	20 µg proteína	40 µg proteína	Muestras
µl ASB (1 mg/ml)	-	5	10	20	40	-
µl muestra	-	-	-	-	-	100
µl solución C	930	925	920	910	890	830

Tabla 8.2: Reactivos requeridos para el método de Lowry.

Los tubos se agitaron y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó a cada uno de ellos 70 µl de solución D, se agitaron e incubaron nuevamente 15 minutos a temperatura ambiente.

Cuantificación de proteínas mediante el ensayo de Bradford

Protocolo:

Se utilizó como estándar de proteína una solución madre de ASB (1 mg/ml), a partir de la cual se prepararon diluciones para luego obtener una curva de calibración. Finalmente, se prepararon las mezclas como indica la Tabla 8.3:

	0 µg ASB	1 µg ASB	2 µg ASB	3 µg ASB	4 µg ASB	5 µg ASB	Muestra
µl ASB de la dilución correspondiente	-	5	5	5	5	5	-
µl H ₂ O bidestilada	5	-	-	-	-	-	2,5
µl reactivo de Bradford	250	250	250	250	250	250	250
µl muestra	-	-	-	-	-	-	2,5

Tabla 8.3: Reactivos utilizados para el ensayo de Bradford.

Ensayo de TBARS

Reactivos:

- SDS al 8.1% (p/v) en agua bidestilada.
- Solución de ácido acético al 10% (v/v) en agua bidestilada a pH 3,5.
- Solución ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.8 % (p/v) en agua bidestilada.

- TBARS o MDA (0.9 ng/μl).

Dada la concentración de la solución estándar de TBARS (0.9 ng/μl) se realizó una dilución 1/10 de la misma y se prepararon las mezclas según lo muestra la Tabla 8.4:

	Curva estándar de MDA (ng)						Muestra
	0	5	15	40	75	100	
TBARS (diluída 1/10 de la madre)	-	5 μl	15 μl	40 μl	75 μl	100 μl	-
Agua bidestilada	100 μl	95 μl	85 μl	60 μl	25 μl	-	-
SDS 8.1%	35 μl	35 μl	35 μl	35 μl	35 μl	35 μl	35 μl
AcH 10%	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
TBA 1.6%	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Muestra	-	-	-	-	-	-	100 μl

Tabla 8.4: Reactivos requeridos para el ensayo de TBARS.