



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.

Tesis de posgrado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias
Biológicas

Efecto de un extracto estandarizado de *Zuccagnia punctata* y
productos fitoterápicos obtenidos del mismo sobre la función
vascular en un modelo de hipercolesterolemia temprana

Lic. Cs. Biol. Julieta Roco

INSIBIO (CONICET-UNT)

-2018-



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.

Tesis de posgrado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias
Biológicas

Efecto de un extracto estandarizado de *Zuccagnia punctata* y
productos fitoterápicos obtenidos del mismo sobre la función
vascular en un modelo de hipercolesterolemia temprana

Lic. Cs. Biol. Julieta Roco

Director: Dra. Susana Josefina Jerez

Codirector: Mirta Asunción Medina

Efecto de un extracto estandarizado de *Zuccagnia punctata* y productos fitoterápicos obtenidos del mismo sobre la función vascular en un modelo de hipercolesterolemia temprana

RESUMEN

Antecedentes: Dentro de los factores de riesgo cardiovascular (FRCV), la hipercolesterolemia es considerada la causa más frecuente de enfermedad coronaria y da inicio a un proceso de disfunción vascular caracterizado por alteraciones estructurales y funcionales que incluyen en su génesis estrés oxidativo y procesos inflamatorios. Estudios clínicos recientes evidencian que algunos compuestos fitoterápicos mejorarían los procesos fisiopatológicos de la hipercolesterolemia. En este sentido, se ha demostrado que los flavonoides tienen efectos benéficos sobre la función vascular por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. En estudios previos desarrollamos un modelo experimental de hipercolesterolemia inducida por una dieta rica en colesterol al 1% (DH) caracterizado por disfunción endotelial e incremento de la respuesta contráctil a angiotensina II (Ang II) inducida por la liberación de metabolitos vasoconstrictores, proceso mediado por la enzima ciclooxigenasa (COX). Asimismo, se ha demostrado *in vitro* que *Zuccagnia punctata* (Zp), especie endémica argentina rica en flavonoides, tiene un efecto antioxidante y antiinflamatorio inhibidor de la COX. Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de un extracto estandarizado de Zp (ZpE) y productos fitoterápicos presentes en el mismo sobre la función vascular en un modelo de conejo con hipercolesterolemia. *Metodología y Resultados:* A) Se elaboró un extracto hidroalcohólico (ZpE) a partir las partes aéreas de Zp (hojas y tallos) y se lo estandarizó químicamente. Los principales flavonoides presentes en ZpE fueron: 2',4',-dihidroxichalcona (DHC), 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (DHMC), 7-hidroxi flavanona (HF), y 3,7-dihidroxi flavona (DHF). Se caracterizó el efecto *in vitro* del ZpE y sus principales flavonoides sobre la reactividad vascular en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) y DH durante 6 semanas. Se observó: efecto vasorelajante del ZpE y sus principales flavonoides (DHC, HF y DHF) dependiente de la concentración, efecto sobre la relajación a acetilcolina (Ach) en arterias de animales con DH que depende del compuesto estudiado y su concentración (DHC 10^{-5} M mejora la relajación

máxima, mientras que todas las concentraciones del ZpE y HF y las concentraciones más bajas de DHC y DHF mejoran la sensibilidad a la Ach), efecto inhibitor de la respuesta contráctil a Ang II en el grupo DH (concentraciones altas del ZpE, DHC y DHF actúan como antagonistas no competitivos, mientras que concentraciones bajas se comportan como antagonistas competitivos). B) Se caracterizó el efecto *in vivo* de la administración oral de ZpE. Se realizó un estudio de dosis efectiva en animales alimentados con DC (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día). Se seleccionó la dosis de 2,5 mg EAG/día y se administró a animales con DH. Se observó: disminución en los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, presión arterial media, glutamato-oxalacetato transaminasa y bilirrubina; mejora en los parámetros de estrés oxidativo, hematocrito, número de leucocitos, alteraciones histológicas (relación íntima/media y el área sudanofílica) y de la función endotelial (aumento de la respuesta relajante a la Ach) y la función vascular (reducción de la respuesta contráctil a Ang II y noradrenalina). *Conclusión:* El ZpE rico en flavonoides tiene efectos benéficos sobre la función vascular a través de mecanismos vasodilatadores y antagonistas de la Ang II, sumado a su propiedad hipocolesterolemica cuando es administrado oralmente. Estos hallazgos validan científicamente el uso del ZpE como producto fitoterápico para la prevención de FRCV relacionados con la hipercolesterolemia y la disfunción endotelial.

PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES CON REFERATO

1. Roco J, Alarcón G, Medina M, Zampini C, Isla M, Jerez S, (2018). Oral administration of *Zuccagnia punctata* extract improves lipid profile, reduces oxidative stress and prevents vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*, 48:104-111.
2. Roco J, Alarcón G, Sierra L, Zampini C, Isla M, Jerez S, (2017). Beneficial effects of hydroalcoholic extract and flavonoids from *Zuccagnia punctata* in a rabbit model of vascular dysfunction induced by high cholesterol diet. *Medicinal Chemistry Research*, 26:2336–2344.

RESUMENES PUBLICADOS EN REVISTAS DE CIRCULACIÓN PERIÓDICA:

1. Oral administration of *Zuccagnia punctata* extract has beneficial effect in hypercholesterolemic rabbits. Roco J, Alarcón G, Zampini C, Isla M, Jerez S. *Medicina*, 2017. Gráfica Taddeo, ISSN 1669-9106
2. Efecto vasorrelajante y antagonista de la angiotensina II de flavonoides naturales en aorta de conejos hipercolesterolémicos. Roco J, Alarcón G, Sierra L, Zampini C, Isla M, Peral M, Jerez S. *Hipertensión Arterial y Riesgo Cardiovascular*, 2015. Elsevier (España), ISSN 1889-1837, 32 (2): 45-95

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS:

1. Caracterización de la administración oral del extracto de *Zuccagnia punctata* como antagonista de la angiotensina II en aorta aislada de conejos. Georgieff E, Roco J, Jerez S. XXIII Jornadas Jóvenes Investigadores AUGM. La Plata, Argentina (2015).
2. Caracterización de *Zuccagnia punctata* como antagonista de la angiotensina II en aorta aislada de conejos hipercolesterolémicos. Roco J, Alarcón G, Sierra L, Zampini C, Isla M, Jerez S. XLVI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Buenos Aires, Argentina (2014).

3. Efecto del extracto estandarizado y flavonoides aislados de *Zuccagnia punctata* sobre la reactividad vascular en un modelo animal hipercolesterolémico. Roco J, Alarcón G G, Scacchi F, Sierra L, Medina M, Zampini C, Isla M, Jerez S. XI Jornadas de Comunicaciones Facultad de Ciencias Naturales e IML. San Miguel de Tucumán, Argentina (2013).
4. Efecto de un extracto estandarizado de *Zuccagnia punctata* y flavonoides aislados sobre la reactividad vascular en un modelo animal hipercolesterolémico. Roco J, Jerez S. XI Jornadas de Jovenes Investigadores AUGM. Corrientes, Argentina (2013).
5. Efecto del extracto estandarizado y de un flavonoide aislado de *Zuccagnia punctata* sobre la reactividad vascular en aorta de conejos hipercolesterolémicos. Roco J, Alarcón G, Scacchi F, Sierra L, Medina M, Zampini C, Isla M, Peral M, Jerez S. XIV Reunión de Investigación en Ciencias de la Salud de la Facultad de Medicina de la UNT. Tucumán, Argentina (2012).

ABREVIATURAS

- **ABCG5/8:** proteínas transportadoras de unión a adenosina trifosfato
- **ACAT:** Acil-CoA:colesterol aciltransferasa
- **Ach:** Acetilcolina
- **Ang II:** Angiotensina II
- **Apo-B48:** Apolipoproteína B-48
- **CCR:** Curva concentración respuesta
- **CE:** Célula endotelial
- **CFF:** Compuestos fenólicos flavonoides
- **CFNF:** Compuestos fenólicos no flavonoides
- **CFT:** Compuestos fenólicos totales
- **CL:** Colesterol libre
- **CT:** Colesterol total
- **CEPT:** Proteína de transferencia de éster de colesterol
- **COX:** Enzima ciclooxigenasa
- **COX-2:** Enzima ciclooxigenasa inducible
- **DC:** Dieta control
- **DC-ZpE_{2,5}:** Grupo dieta control + ZpE (2,5 mg EAG/día)
- **DC-ZpE₅:** Grupo dieta control + ZpE (5 mg EAG/día)
- **DC-ZpE₁₀:** Grupo dieta control + ZpE (10 mg EAG/día)
- **DGAT:** Diacilglicerol aciltransferasa
- **DH:** Dieta hipercolesterolémica al 1%
- **DHC:** 2',4'-dihidroxichalcona
- **DHF:** 3,7-dihidroxi flavona
- **DHMC:** 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona
- **DH-Ro_{2,5}:** Grupo DH + rosuvastatina (2,5 mg EAG/día)
- **DH-ZpE_{2,5}:** Grupo DH + ZpE (2,5 mg EAG/día)
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **E:** Endotelio
- **EAG:** Equivalentes de ácido gálico
- **EC:** Enfermedad cardiovascular
- **Eco:** Éster de colesterol
- **ECV:** Enfermedad cardiovascular

- **EC₅₀**: Concentración necesaria para alcanzar la mitad de la R_{max}
- **ERO**: Especies reactivas del oxígeno
- **FRCV**: Factor de riesgo cardiovascular
- **GOT**: Glutamato oxalacetato transaminasa
- **GPT**: Glutamato piruvato transaminasa
- **GR**: Glóbulos rojos
- **GSH**: Glutathion reducido
- **GSSG**: Glutathion oxidado
- **IDL-C**: Colesterol unido a lipoproteína de alta densidad
- **H&E**: Hematoxilina-Eosina
- **HF**: HF: 7-hidroxi-flavonona
- **HMGR**: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
- **Hto**: Hematocrito
- **IDL-C**: Colesterol unido a lipoproteína de densidad intermedia
- **LDL-C**: Colesterol unido a lipoproteína de baja densidad
- **LDLr**: Receptor de LDL-C
- **LDLox**: LDL-C oxidada
- **LP**: Lipasa pancreática
- **LPL**: Lipoproteína lipasa
- **LOX**: Lipoxigenasa
- **LXR**: Receptores nucleares LX
- **NA**: Noradrenalina
- **NP**: Nitroprusiato de sodio
- **NPC1L1**: Transportador Niemann-Pick C1-like 1
- **NO**: Óxido nítrico
- **NOS**: Óxido nítrico sintasa
- **MBC**: Membrana del borde en cepillo
- **MLV**: Músculo liso vascular
- **MTP**: Proteína de transferencia microsomal de triglicéridos
- **O₂⁻**: Anión superóxido
- **·OH**: Radical hidroxilo
- **PAM**: Presión arterial media
- **pEC₅₀**: Logaritmo negativo de EC₅₀
- **Phe**: Fenilefrina
- **QM**: Quilomicrones

- **RE:** Retículo endoplasmático
- **R_{máx}:** Respuesta máxima
- **SR-B1:** receptor captador hepático
- **SREBP:** Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides
- **TBA:** Ácido tiobarbitúrico
- **TCA:** Ácido tricloroacético
- **TG:** Triglicéridos
- **VLDL-C:** colesterol unido a lipoproteína de muy baja densidad
- **ZpE:** Extracto estandarizado de *Zuccagnia punctata*
- **Z. punctata:** *Zuccagnia punctata*

ÍNDICE

I- Antecedentes.....	1
1- Las enfermedades cardiovasculares	2
1.1- La hipercolesterolemia como factor de riesgo cardiovascular.....	2
2- Homeostasis del colesterol.....	4
2.1- Absorción de Colesterol.....	6
2.2- Síntesis y excreción de Colesterol.....	8
3- Disfunción vascular generada por hipercolesterolemia	12
3.1- Tono vascular	12
3.2- Disfunción vascular.....	14
4- Modelos experimentales de hipercolesterolemia	15
5- Terapias hipocolesterolémicas actuales	16
6- Compuestos fenólicos con propiedades cardioprotectoras	18
6.1- Flavonoides	19
6.2- Papel de los flavonoides en el sistema cardiovascular	20
6.3- Chalconas: características y propiedades en el sistema cardiovascular	21
7- <i>Zuccagnia punctata</i>	22
7.1- Clasificación y composición	22
7.2- Propiedades terapéuticas documentadas de <i>Z. punctata</i>	23
8- Objetivo general.....	25
8.1- Objetivos específicos	25
9- Hipótesis	25
10- Relevancia.....	25
II- Materiales y Métodos.....	26
1- Materiales	27
1.1- Material Vegetal	27
1.1.1- Elaboración y estandarización del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i>	27
1.1.2- Separación e identificación de los principios activos	28
1.2- Animales experimentales y dietas	29
1.2.1- Elaboración de la dieta rica en colesterol	29
2- Técnicas.....	30
2.1- Reactividad Vascular	30
2.1.1- Sistema de registro de contractilidad isométrica en aorta torácica	30
2.1.2- Registro de contracciones	31
2.1.3- Curva Concentración Respuesta (CCR).....	32

2.1.4- Estimulación única	33
2.1.5- Solución fisiológica de Krebs	34
2.1.6- Drogas usadas	34
3- Metodología	34
3.1- Ensayos <i>in vitro</i>	34
3.1.1- Parámetros bioquímicos y clínicos	35
3.1.2- Efecto del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i> y sus flavonoides sobre la función vascular: Protocolos experimentales de reactividad vascular	35
3.1.2.1- Efecto vasodilatador	35
3.1.2.2- Efecto sobre la función endotelial.....	36
3.1.2.3- Efecto sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina	37
3.1.2.4- Efecto sobre la respuesta contráctil a angiotensina II	37
3.2- Ensayos <i>in vivo</i>	38
3.2.1- PARTE I: Efecto de la administración oral del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i> en conejos controles - Ensayos de toxicidad y Estudio de Rango de Dosis.....	38
3.2.1.1- Ensayo de toxicidad aguda: Administración oral de 250 mg EAG/ml del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i>	38
3.2.1.2- Ensayo de toxicidad crónica y estudio de rango de dosis: Administración oral de 2,5 – 5 – 10 mg EAG/día del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i>	38
3.2.1.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos	39
3.2.1.2.2- Efecto sobre la función vascular: Protocolos experimentales de reactividad vascular.....	40
3.2.1.2.2.1- Efecto sobre la función endotelial.....	40
3.2.1.2.2.2- Efecto sobre la reactividad del músculo liso.....	41
3.2.2- PARTE II: Efecto de la administración oral de 2,5 mg EAG/día del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i> en conejos alimentados con una dieta enriquecida en colesterol al 1 %.....	41
3.2.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos.....	43
3.2.2.2- Efecto sobre la función vascular: Protocolos experimentales de reactividad vascular	43
3.2.2.3- Efecto sobre parámetros de estrés oxidativo	43
3.2.2.3.1- TBARS	43
3.2.2.3.2- GSH/GSSG.	43
3.2.2.4- Efecto sobre la morfohistología vascular	44
3.2.2.4.1- Histometría	44
3.2.2.4.2- Porcentaje de área sudanofílica	44

4- Análisis estadísticos	45
III- Resultados.....	46
1- Estandarización del extracto hidroalcohólico de <i>Zuccagnia punctata</i> : Análisis de marcadores químicos	47
2- Parámetros bioquímicos y clínicos.....	48
3- Resultados de ensayos <i>in vitro</i>	48
3.1- Efecto vasodilatador	48
3.2- Efecto sobre la función endotelial	49
3.3- Efecto sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina	50
3.4- Efecto sobre la respuesta contráctil a angiotensina II.....	51
4- Resultados de ensayos <i>in vivo</i>	54
4.1- PARTE I: Efecto de la administración oral del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i> en conejos controles.....	54
4.1.1- Ensayo de toxicidad aguda: Administración oral de 250 mg EAG/ml del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i>	54
4.1.2- Estudio de la dosis terapéutica efectiva: Administración oral de 2,5 - 5 - 10 mg EAG/día del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i>	55
4.1.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos.....	55
4.1.2.2- Efecto sobre la función endotelial.....	56
4.1.2.3- Efecto sobre la reactividad del músculo liso	56
4.2- PARTE II: Efecto de la administración oral de 2,5 mg EAG/día del extracto de <i>Zuccagnia punctata</i> en conejos alimentados con dieta enriquecida en colesterol al 1% ..	57
4.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos	57
4.2.2- Efecto sobre la función endotelial.....	58
4.2.3- Efecto sobre la reactividad del músculo liso	59
4.2.4- Efecto sobre parámetros de estrés oxidativo.....	61
4.2.5- Efecto sobre la morfohistología vascular.....	63
4.2.5.1- Histometría.	63
4.2.5.2- Porcentaje de área sudanofílica	65
IV- Discusión	66
V- Conclusión	78
VI- Bibliografía.....	79

I- ANTECEDENTES

1- LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Se estima que 17,7 millones de personas murieron a causa de ECV en el año 2017, lo que representa el 31% de todas las muertes en el mundo. De estas, se estima que 7,4 millones fueron debidas a enfermedades coronarias y 6,7 a accidentes cerebrovasculares, lo que representa el 80% de las muertes por ECV. De continuar esta tendencia, el número de muertes por ECV podría llegar a 23,3 millones en 2030. La mayoría de las ECV tiene como factores de riesgo a la hipercolesterolemia, el tabaquismo, las dietas no saludables, la inactividad física, la presión arterial elevada, la obesidad y la diabetes (OMS, 2017).

1.1- La hipercolesterolemia como factor de riesgo cardiovascular

La enfermedad coronaria es la ECV más común (OMS, 2017). Los estudios epidemiológicos, clínicos, genéticos y experimentales indican que la hipercolesterolemia es la causa más frecuente de enfermedad coronaria (Karnik, 2001). Se caracteriza por la presencia de niveles elevados de colesterol total (CT; > 200 mg/dl) y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en la sangre. El colesterol elevado causa el 18 % de la enfermedad cerebrovascular y el 59 % de la enfermedad coronaria, explicando el 7,9 % de todas las muertes (OMS, 2001). En Argentina, la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (2015) muestra entre el año 2005 y 2013 un aumento del 27,9 al 29,8 % de la población que presenta valores de colesterol elevado en sangre, sin diferencias entre ambos sexos.

La aterosclerosis es un proceso degenerativo de los vasos sanguíneos que comienza con el depósito de lipoproteínas y células inflamatorias en la pared arterial con formación de estrías grasas (formadas por macrófagos saturados de lípidos y células musculares lisas de la pared arterial) que progresan a placas complejas (con centro necrótico lipídico y capa externa fibrosa). Posteriormente estas placas se pueden romper, induciendo la formación de trombos y dando lugar a la sintomatología clínica de la ECV (Badimon y Vilahur, 2012).

Dentro del concepto actual de continuum cardiovascular, debemos considerar que los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) tales como dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo y obesidad, son los responsables del inicio de un proceso de disfunción vascular que puede progresar hacia la aterosclerosis, la necrosis miocárdica y el fallo cardíaco

(Dzau y col., 2006). Las alteraciones fisiopatológicas producidas durante la hipercolesterolemia, incluyen estrés oxidativo, procesos inflamatorios (Serrano y col., 2001) y remodelado vascular, como respuesta a la injuria vascular. Esto sucede por la presencia de niveles elevados de CT y LDL-C que predispone a la acumulación de lípidos en la pared vascular desencadenando un proceso degenerativo de los vasos sanguíneos que comienza con la oxidación de las LDL-C (Fig. 1). Estas LDL-C oxidadas (LDLox) activan al endotelio vascular originando la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y factores de crecimiento que inician el reclutamiento de células proinflamatorias e interrelacionan los distintos tipos celulares que intervienen en la formación de la placa. Seguidamente se produce una acumulación lipídica en los macrófagos dando lugar a la formación de células espumosas; y finalmente ocurre la proliferación y migración de las células musculares lisas hacia la íntima arterial. Todo esto lleva al progreso de la placa aterosclerótica, conduciendo finalmente a la oclusión del lumen arterial (Tegos y col., 2001).

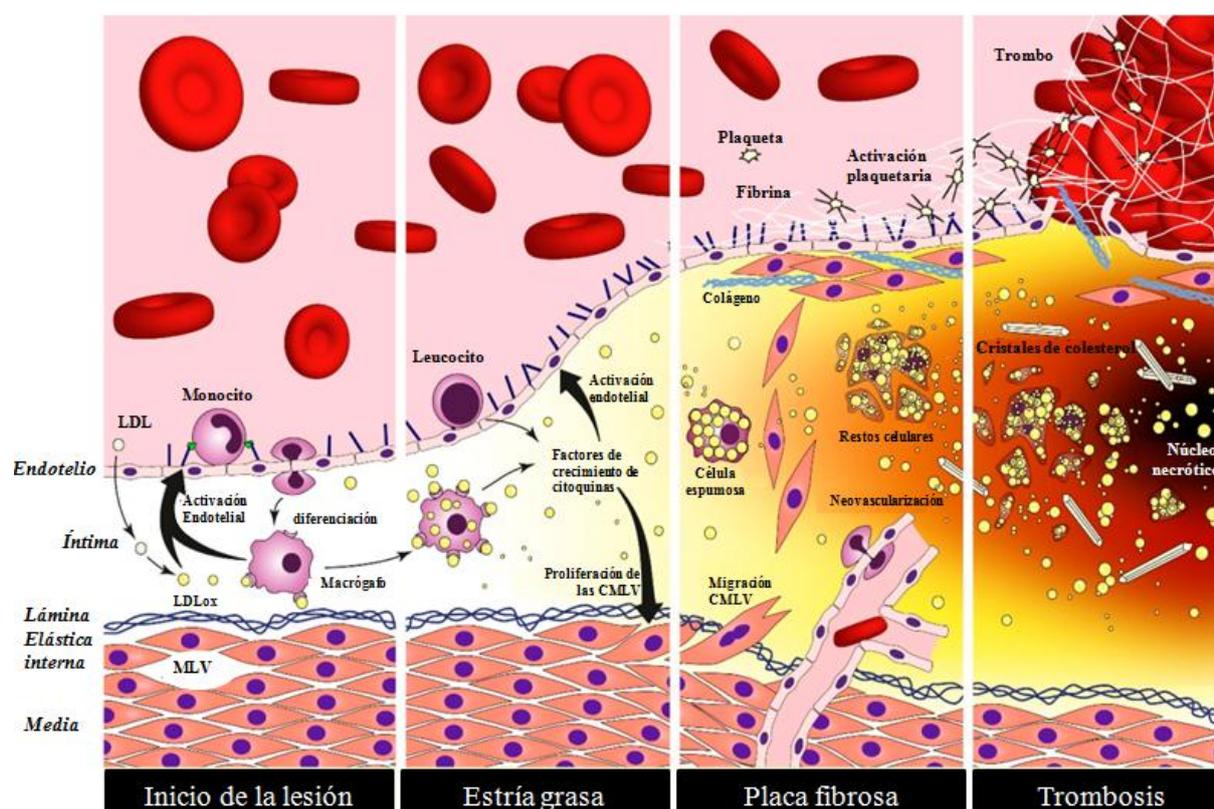


Fig. 1: Remodelado vascular progresivo (modificado de Stein y Kaufmann, 2015).

La función endotelial depende en gran medida del balance entre los agentes vasoconstrictores y vasodilatadores que el endotelio produce y libera hacia la circulación y hacia el músculo liso. El óxido nítrico (NO) es el principal metabolito vasodilatador que se libera en respuesta al estrés mecánico que produce el flujo sanguíneo (Zhao y col., 2015). La

acumulación de lípidos en la pared vascular durante la hipercolesterolemia produce disfunción endotelial, afectando la liberación y con ello, la biodisponibilidad de NO aún antes de la formación de la placa ateromatosa (Sorensen y col., 1994; Jerez y col., 2008).

La disminución de los niveles de colesterol en el suero da como resultado una disminución de la morbilidad y la mortalidad. Ensayos de prevención primaria y secundaria han mostrado reducciones marcadas en eventos coronarios, mortalidad total y mortalidad por cardiopatía coronaria como consecuencia de la reducción a largo plazo del CT y las concentraciones de LDL-C con la ayuda de la farmacoterapia (Warren y col., 2016).

Para aplicar una farmacoterapia efectiva y alcanzar los niveles de colesterol y LDL-C plasmáticos propuestos, es necesario conocer los mecanismos involucrados en la homeostasis del colesterol con énfasis en la síntesis de colesterol en el hígado y la absorción desde el intestino delgado, y sus implicancias para el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia (Gylling y col., 2004).

2- HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL

La homeostasis del colesterol se encuentra entre los procesos más intensamente regulados en el organismo. Desde su aislamiento a partir de cálculos biliares, el colesterol ha sido ampliamente estudiado ya que constituye uno de los elementos más importantes de las membranas celulares de los mamíferos: sirve para modular su fluidez y permeabilidad. El colesterol también es el precursor de las hormonas esteroideas y los ácidos biliares y desempeña un papel clave en el transporte de membrana, los procesos de señalización transmembrana y la proliferación celular (Fernandez y col., 2005; Nelson y col., 2013; Afonso y col., 2018).

A pesar de sus funciones vitales, los niveles anormales de colesterol pueden tener graves consecuencias y conducir a enfermedades como la aterosclerosis según lo expresado previamente (Ikonen y col., 2006).

La homeostasis del colesterol en el organismo (Fig. 2) se logra mediante un equilibrio entre la síntesis endógena, la absorción intestinal y la secreción de ácidos biliares y colesterol (Trapani y col., 2012; Cohen, 2008). Todos estos procesos están estrechamente vinculados y un cambio en uno de ellos puede influir significativamente en los demás (Morgan y col., 2016).

Dado que los ácidos biliares son reabsorbidos eficientemente y una parte del colesterol biliar es reabsorbido en el intestino, el balance global del colesterol depende de que las entradas (síntesis y dieta) se equilibren con las pérdidas (excreción fecal). El colesterol excretado con las heces depende de la eficiencia de la absorción intestinal del colesterol biliar y dietético. Por eso la regulación de la absorción intestinal del colesterol (Fig. 3) es de gran interés como diana terapéutica para reducir las cifras de colesterol plasmático (Morgan y col., 2016).

El hígado es considerado el principal órgano encargado del mantenimiento de la homeostasis del colesterol. La molécula de colesterol tetracíclico de 27 carbonos se sintetiza a partir de acetato en una serie de 30 reacciones enzimáticas (Fig. 4). La enzima limitante de la velocidad de síntesis es la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (HMGR) que controla la tasa de síntesis al regular la conversión de HMG-CoA a mevalonato, precursor del colesterol (Ikonen, 2018).

Por otra parte, las células de los tejidos periféricos han desarrollado mecanismos complejos para regular la cantidad y distribución de esteroides en su interior. Estas células obtienen colesterol desde la circulación a partir de lipoproteínas plasmáticas o producen colesterol intracelularmente (Fig. 2) mediante procesos de síntesis a partir de acetil coenzima A (acetil-CoA). Este proceso está estrechamente regulado en múltiples niveles (Ikonen y col., 2018).

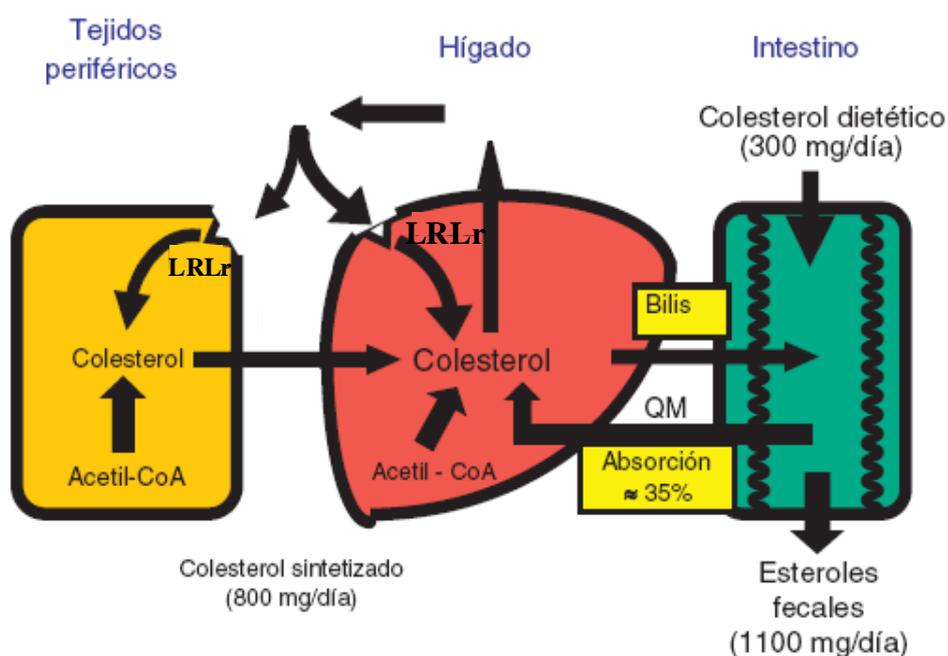


Fig. 2: Homeostasis general del colesterol en el organismo (Ros, 2006); LDLr: receptor de LDL; QM: quilomicrones.

2.1- Absorción de colesterol

La absorción de colesterol en el intestino delgado proximal representa la vía principal para la entrada de colesterol procedente de la dieta. Hay tres fases principales involucradas en la absorción del colesterol (Fig. 3, Afonso y col., 2018). La primera ocurre intraluminalmente y culmina en la solubilización micelar del colesterol no esterificado, lo que facilita su movimiento hasta la membrana del borde en cepillo (MBC) del enterocito. La segunda fase implica el transporte de colesterol a través de la MBC por el transportador Niemann-Pick C1 Like-1 (NPC1L1), que regula la absorción neta de colesterol en el intestino delgado superior (Altmann y col., 2004). La tercera fase involucra una serie de pasos dentro del enterocito. La molécula de colesterol se esterifica con un ácido graso en un proceso mediado por acil-CoA-colesterol-acil-transferasa (ACAT₂), una enzima localizada en la membrana del retículo endoplásmico (Nguyen y col., 2011). El colesterol libre vuelve a la luz intestinal a través de transportadores de unión a adenosina trifosfato (ABC) ABCG5/G8. Los ésteres de colesterol (ECo), los triglicéridos (TG) y la apolipoproteína B-48 (apo B-48) se procesan adicionalmente en el complejo de Golgi para formar quilomicrones, que luego se transfieren al sistema linfático (Iqbal y Hussain, 2009; Afonso y col., 2018). La expresión de NPC1L1 y ABCG5 / 8 está controlada por los sensores de colesterol, los receptores nucleares LX (LXR), a través de sus dos isoformas LXR α y LXR β . Ambos inhiben NPC1L1 y activan ABCG5/G8 induciendo la excreción de colesterol de regreso al lumen. LXR también puede inducir el eflujo de colesterol mediado por ABCA1 (aumentando su expresión) para prevenir la acumulación de colesterol en los enterocitos. Ambas isoformas de LXR actúan como sensores de colesterol y parecen ejercer efectos similares sobre la expresión de estas proteínas (Hu y col., 2012). En conjunto, los efectos de LXR previenen la acumulación de colesterol en los enterocitos.

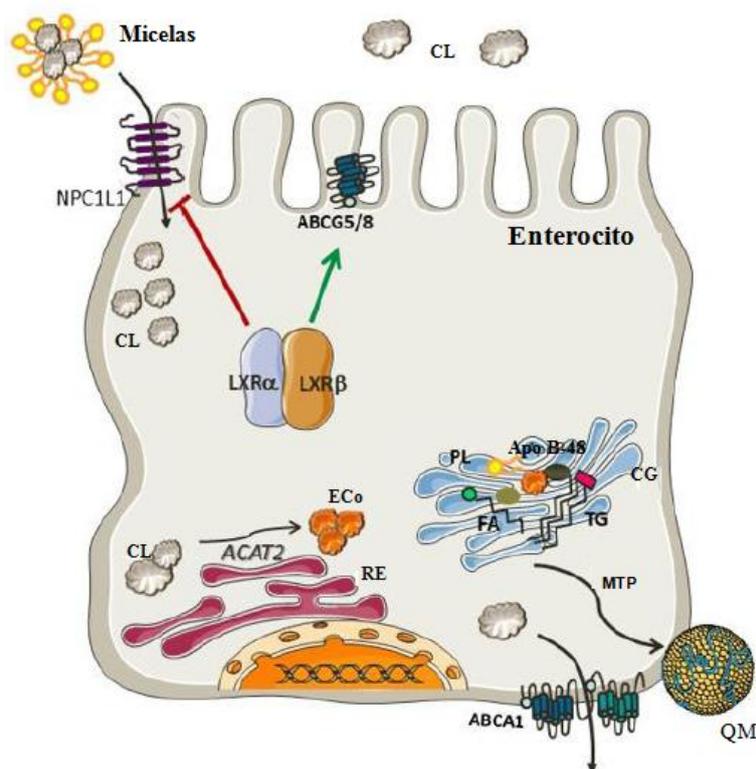


Fig. 3: Mecanismos involucrados en la absorción de colesterol. El colesterol libre (CL) transportado en las micelas ingresa al enterocito a través de NPC1L1 y es esterificado por ACAT₂ en el retículo endoplasmático (RE). El colesterol libre vuelve a la luz intestinal a través de transportadores ABCG5/G8. El éster de colesterol (ECO), los triglicéridos (TG) y la apolipoproteína B-48 (apo B-48) se procesan adicionalmente en el complejo de Golgi (CG) para formar quilomicrones (QM) por acción de la proteína de transferencia de triglicérido microsomal (MTP). Los QM luego se transfieren al sistema linfático. La expresión de NPC1L1 y ABCG5/8 está controlada por los sensores de colesterol LXR α y LXR β . Ambas isoformas inhiben NPC1L1 y activan ABCG5/G8 induciendo la excreción de colesterol de regreso al lumen. LXR también puede inducir eflujo de colesterol mediado por ABCA1 para prevenir la acumulación de colesterol en los enterocitos. (Modificado de Afonso y col., 2018).

La ganancia de colesterol por día en una persona es entre 1 y 1,5 gramos a partir de la síntesis en los tejidos y la ingesta dietética. Se supone que la ingesta media diaria de colesterol para las personas que consumen una dieta occidental típica es de alrededor de 300-400 mg. La velocidad con la que el cuerpo sintetiza el colesterol promedia aproximadamente 10 mg / día / kg de peso corporal, pero esto puede variar con los cambios en la ingesta de colesterol (Duane y col., 1995; McMurry y col., 1985). En el transcurso del día, una cantidad de colesterol similar a la que ingresa al cuerpo se elimina en diversas formas, predominantemente como ácidos biliares y diversos metabolitos del colesterol en las heces. Este equilibrio entre entrada y salida asegura que el contenido de colesterol en todo el cuerpo permanezca esencialmente constante durante largos períodos de tiempo.

2.2- Síntesis y excreción de colesterol

El hígado es el principal encargado del mantenimiento de la homeostasis del colesterol. Acá tienen lugar muchos mecanismos, como la biosíntesis, a través de la actividad de la HMGR, la captación de colesterol a través de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr), la liberación de lipoproteínas a la sangre, el almacenamiento de colesterol por esterificación y, la degradación y conversión en ácidos biliares (Trapani y col., 2012).

La síntesis de colesterol en el hígado está mediada por una extensa serie de reacciones (Fig. 4). El colesterol obtenido a partir de la síntesis en los hepatocitos puede esterificarse enzimáticamente mediante ACAT e incorporarse a la apolipoproteína B-10 (apo B-100) formando lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C), que luego se secretan al torrente sanguíneo (Fig. 6) para dirigirse a tejidos periféricos (Bays y col., 2008). A su vez, las VLDL-C pueden eliminarse de la circulación por los LDLr hepáticos. Alternativamente, el componente de TG de las VLDL-C se hidroliza por la lipoproteína lipasa (LPL), dejando partículas remanentes de VLDL-C, denominadas lipoproteínas de densidad intermedia (IDL-C) (Beisiegel, 1998; Havel, 1987). Las IDL-C son captadas por receptores remanentes o LDLr en el hígado, o convertidas por la lipasa hepática a LDL-C.

La síntesis de colesterol en los tejidos periféricos también contribuye a la acumulación de colesterol hepático a través de la transferencia de colesterol al hígado en un proceso mediado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) (conocido como transporte inverso de colesterol). Todas las partículas de HDL-C se internalizan en el hígado, interactuando con el receptor captador hepático B1 (SR-B1). Una vez en el hepatocito, el colesterol liberado por las partículas de HDL-C puede utilizarse para las necesidades de colesterol hepático, convertirse en ácidos biliares o excretarse a la bilis y eliminarse a través de las heces (Ikonen y col., 2006).

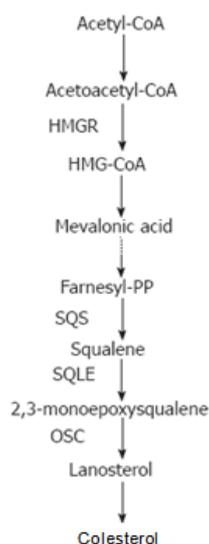


Fig. 4: Principales reacciones en la ruta biosintética del colesterol. HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; SQS: escualeno sintasa; SQLE: escualeno epoxidasa; OSC: oxidosqualeno ciclasa (modificado de Trapani y col., 2012).

Además de ser sintetizado, el colesterol también puede ingresar al hígado a través de endocitosis mediada por receptor. LDLr desempeña un papel importante en la homeostasis del colesterol, ya que se une a las partículas de LDL-C que circulan en el plasma, lo que reduce los niveles de colesterol sistémico (Segatto y col., 2011).

La síntesis y expresión de los LDLr y de la HMGR, están reguladas por una familia de factores de transcripción llamados proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), vinculados a la transcripción de LDLr, HMGR y otras proteínas involucradas en el metabolismo del colesterol, en función de la cantidad de esteroides celular (Fig. 5, Afonso y col., 2018). Los SREBP se ubican en la membrana del retículo endoplasmático (RE) donde permanecen inactivados. En el RE, el dominio C-terminal del SREBP interactúa con la proteína SCAP (proteína de activación de la escisión) que funciona como un sensor de esteroles (Espenshade y Hughes, 2007; Trapani y col., 2012). Cuando la concentración celular de esteroles es baja, SCAP se une a SREBP y lo escinde del RE para dirigirlo al aparato de Golgi donde los SREBP se procesan proteolíticamente para producir fragmentos activos que entran en el núcleo e inducen la expresión de sus genes diana (por ejemplo, LDLr, HMGR). Por otro lado, cuando el contenido de esteroles intracelular aumenta, SCAP se une a la proteína del gen inducido por la insulina (Insig), que mantiene el complejo SREBP/SCAP en el RE, bloqueando así la transcripción de los genes involucrados en la síntesis del colesterol (Fig. 5, Afonso y col., 2018)

Los SREBP activan la expresión de más de 30 genes implicados en la síntesis y captación de colesterol, ácidos grasos, TG y fosfolípidos. En células hepáticas, hay tres clases de SREBP que regulan la producción de lípidos para su exportación al plasma como lipoproteínas y a la bilis como micelas. Por lo tanto, la activación de SREBP tiene efecto neto sobre los niveles de colesterol en plasma (Horton y col., 2002).

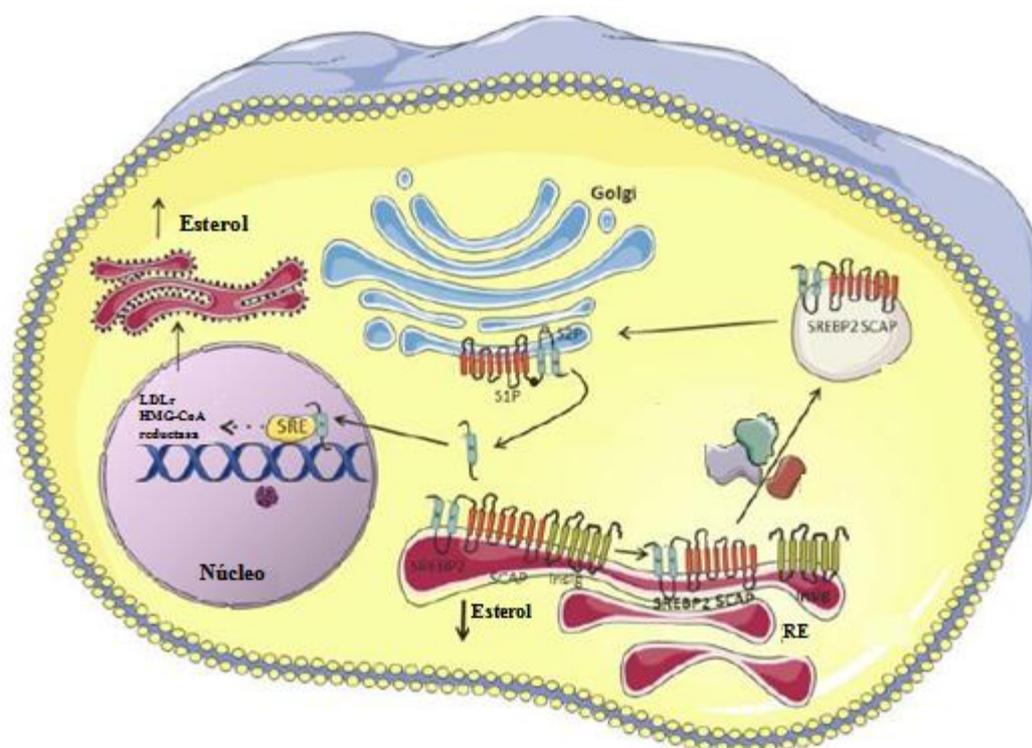


Fig. 5: Mecanismos involucrados en la regulación de la síntesis hepática del colesterol. (Modificado de Afonso y col., 2018)

Los receptores LXR α y LXR β alteran la expresión de múltiples genes implicados en la homeostasis del colesterol. Regulan negativamente la síntesis de colesterol a través de sus efectos sobre la expresión de SREBP-2 y numerosos otros genes que participan en la síntesis del colesterol. La activación de LXR también estimula la producción de LPL. Esta es la enzima limitante de la velocidad para el metabolismo de partículas ricas en TG, que incluyen quilomicrones y VLDL-C. Finalmente, los LXR pueden ayudar a la eliminación del colesterol a través de la regulación positiva de la expresión de la proteína ileal de unión a bilis (I-BABP). Este transportador media el movimiento de los ácidos biliares desde los enterocitos hasta la luz del íleon. Por lo tanto, la regulación coordinada de genes múltiples a través de LXR da como resultado un aumento general en la eliminación de colesterol del cuerpo, una mayor síntesis de colesterol y una absorción reducida. El efecto neto de la activación de LXR

generalmente se traduce en un mecanismo protector contra la sobrecarga de colesterol tisular (Millatt y col., 2003; Chen y col., 2001) (Fig. 6, Chen y col., 2014).

La velocidad de síntesis de colesterol mediada por el hígado varía ampliamente dependiendo de múltiples factores, en particular, la cantidad de colesterol que se le administra desde el intestino delgado (Turley y Dietschy, 1988). Está bien documentado que la manipulación del flujo enterohepático de colesterol o de los ácidos biliares puede impactar notablemente en el manejo intrahepático del colesterol de manera que conduce a cambios clínicamente significativos en la concentración de LDL-C circulante (Davis y Veltri, 2007; Insull, 2006; Sudhop T y von Bergmann, 2002).

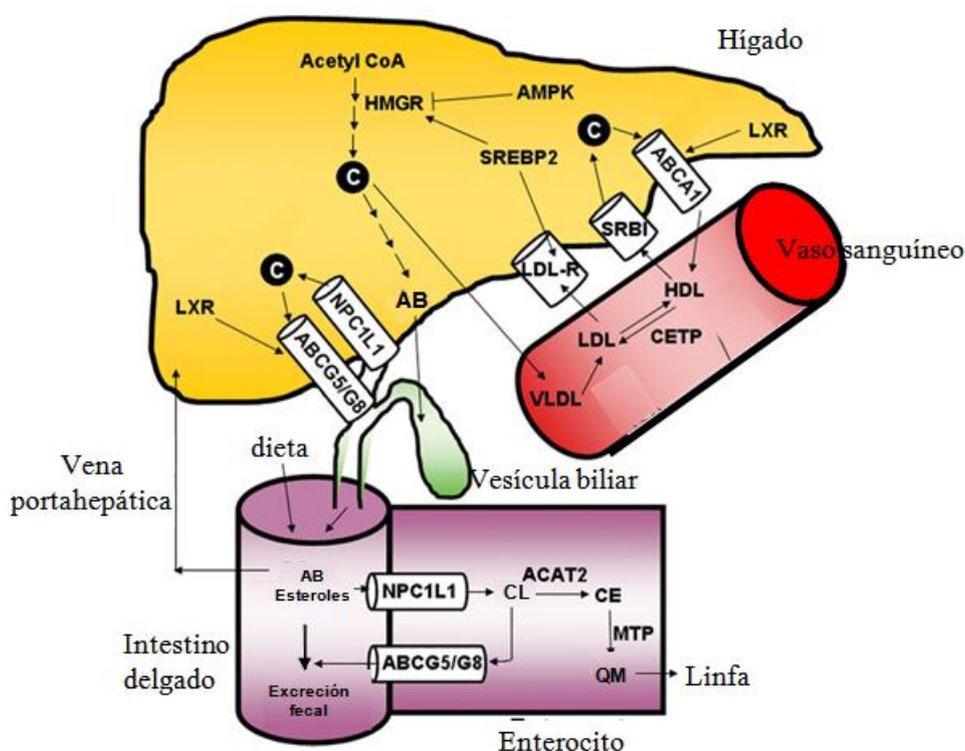


Fig. 6: Descripción general de la homeostasis y la regulación del colesterol en el hígado, intestino delgado y plasma. ABCA1 y ABCG5/G8: transportadores de unión a ATP; ACAT₂: acil-CoA-colesterol-acil-transferasa 2; AMPK: proteína quinasa activada por AMP; AB: ácido biliar; C: colesterol; CETP: proteína de transporte de éster de colesterol; ECo: éster de colesterol; QM: quilomicrones; CL: colesterol libre; HDL-C: colesterol unido a lipoproteína de alta densidad; HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; LDL-C: colesterol unido a lipoproteína de baja densidad; LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad; LXR: receptor nuclear X; MTP: proteína de transferencia de triglicérido microsomal; NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1; SREBP2: proteína 2 de unión al elemento regulador de esterol; SR-B1: receptor captador hepático B1; VLDL-C: colesterol unido a lipoproteína de muy baja densidad (adaptada de Chen y col., 2014).

3- DISFUNCIÓN VASCULAR GENERADA POR HIPERCOLESTEROLEMIA

3.1- Tono vascular

En condiciones fisiológicas normales, el tono vascular está determinado por un equilibrio entre el Sistema Renina-Angiotensina (SRA), el Sistema Nervioso Autónomo (SNA), y la liberación de sustancias desde el endotelio vascular:

a) El SRA está constituido por una cascada enzimática-hormonal, siendo la angiotensina II (Ang II), el principal efector de este sistema y uno de los más potentes vasoconstrictores fisiológicos conocidos. Actúa a nivel de los grandes y pequeños vasos arteriales. La Ang II ejerce sus acciones biológicas a través de los receptores de angiotensina tipo 1 (AT₁) y tipo 2 (AT₂) (Fig. 7). A su vez, la Ang II induce la expresión del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y favorece el crecimiento del músculo liso vascular (MLV). Esto último se evidencia por un efecto trófico de la Ang II sobre los miocitos vasculares, favoreciendo así la aparición de una hipertrofia y/o hiperplasia vascular como respuesta adaptativa ante un estímulo patológico (Mehta y Griendling, 2007).

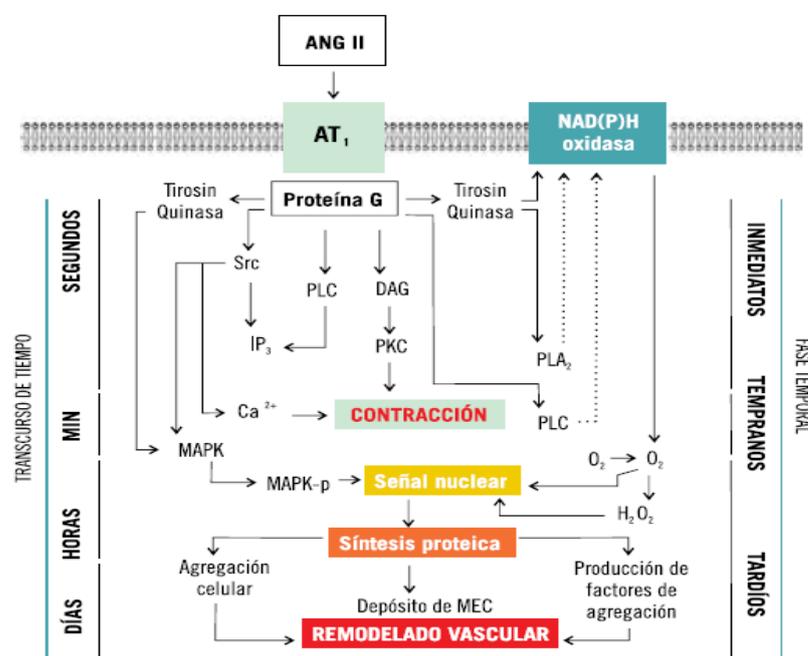


Fig. 7: Eventos de señalización mediados por angiotensina II (Ang II) en células del músculo liso vascular (MLV), (Touyz y Schiffrin, 2000). La unión de Ang II al receptor AT₁ estimula la contracción vascular de forma temprana y, la generación de especies reactivas de oxígeno, la expresión de protooncogenes y el remodelado vascular se producen como eventos de señalización tardía (modificado de Touyz y Schiffrin, 2000).

b) El SNA regula el tono vascular por medio de los sistemas adrenérgicos y colinérgicos (Fig. 8, Sheng y Zhu, 2018): El sistema adrenérgico es responsable de la liberación de la noradrenalina (NA) que actúa a través de los receptores α_1 o α_2 . La NA y la fenilefrina (Phe) son agentes contráctiles comúnmente usados en estudios que emplean vasos sanguíneos aislados. Ambas ejercen una respuesta contráctil sostenida por activación de los receptores α_1 - en algunos lechos vasculares. El sistema colinérgico es responsable de la liberación de acetilcolina (ACh), neurotransmisor que a nivel vascular induce relajación dependiente de endotelio. Se ha demostrado que la activación de los receptores muscarínicos M_3 de la ACh induce un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} . En el endotelio esto estimula a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), mediando la liberación de NO y la vasodilatación (Walch y col., 2001). En cambio, el aumento en los niveles de Ca^{2+} en el MLV, por la activación de los receptores M_3 , provoca vasoconstricción.

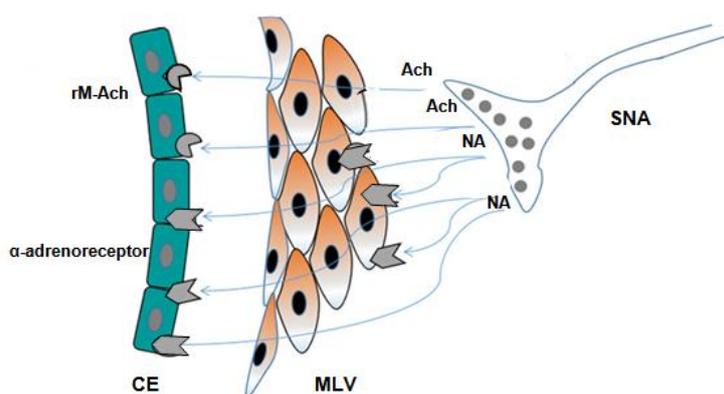


Fig. 8: Esquema de la inervación de los vasos sanguíneos por los neurotransmisores del sistema nervioso autónomo (SNA). Las varicosidades del terminal nervioso autónomo contienen varios neurotransmisores que se liberan y difunden a las células endoteliales (CE) y a las células de músculo liso vascular (MLV). Estas células efectoras expresan una variedad de receptores que interactúan específicamente con los factores vasoactivos del terminal nervioso. NA: noradrenalina, α -adrenoreceptor: receptor de la noradrenalina, ACh: acetilcolina, rM-ACh: receptor muscarínico de la acetilcolina (modificado de Sheng y Zhu, 2018).

c) El endotelio es la monocapa de células que revisten la luz de los vasos sanguíneos, y tiene un rol crucial en la regulación del tono y la homeostasis vascular. Las células endoteliales (CE) sintetizan sustancias o mediadores vasoactivos que influyen en el grado de contracción de las células musculares lisas adyacentes (Sandoo y col., 2010). De este modo, las CE son capaces de responder a diversos estímulos, tanto físicos como químicos, con la liberación de

las sustancias que producen, ya sea vasodilatación junto con un efecto antiagregante plaquetario y antiproliferativo, o vasoconstricción junto con acción procoagulante y proliferativa. Por este motivo, una de las funciones más importantes del endotelio es la regulación del tono arterial normal, el cual está determinado por el balance entre la vasodilatación y la vasoconstricción por relajación o contracción de las células musculares de la capa media (Fig. 9) (Villar y col., 2006).

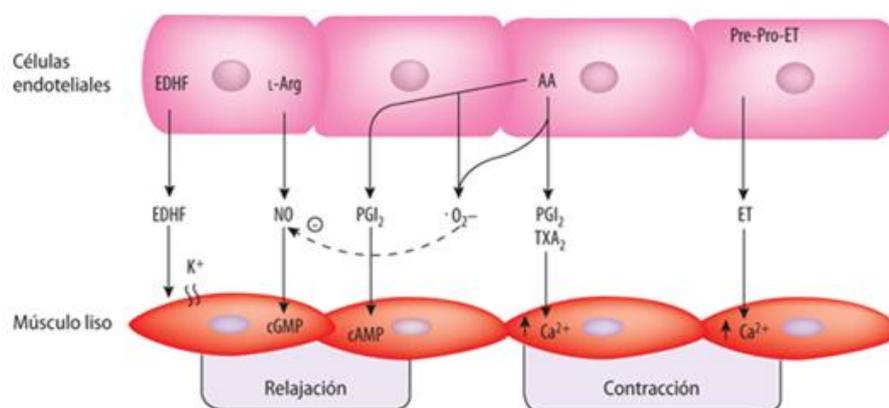


Fig. 9: Regulación del tono vascular mediado por las células endoteliales a través de la liberación de sustancias que inducen vasodilatación (NO, óxido nítrico; EDHF, factor hiperpolarizante derivado de endotelio, PGI₂; prostaciclina) o vasoconstricción (TXA₂, tromboxano; ET, endotelina).

3.2- Disfunción vascular

En condiciones fisiológicas normales, los factores relajantes derivados del endotelio predominan sobre los factores contráctiles (Deanfield y col., 2007). Sin embargo, la presencia de FRCV puede modificar el funcionamiento normal del endotelio y provocar un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que finalmente alteran el tono vasomotor y predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, facilitando el desarrollo de aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis.

La Ang II ejerce un papel importante en la génesis y en las complicaciones de la aterosclerosis ya que estimula la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en los vasos, las cuáles juegan un papel clave en la disfunción endotelial y en la oxidación de las LDL-C (Weiss y col., 2001), implicadas en el proceso de remodelado vascular asociado con ciertos FRCV como la hipertensión, hipercolesterolemia, y otros eventos patológicos. Si bien la disfunción endotelial está caracterizada por un empeoramiento en la biodisponibilidad de

NO, también involucraría un aumento en la producción de prostanoïdes vasoconstrictores (Foudi y col., 2009).

4- MODELOS EXPERIMENTALES DE HIPERCOLESTEROLEMIA

Numerosas especies animales han sido usadas como modelo para estudiar las alteraciones inducidas por hipercolesterolemia, incluyendo conejos (Yanni, 2004), ratones (Temel y Rudel, 2007), cobayos (Fernandez y col., 2001), y primates (Stevenson y col., 1992). Los primates son los más semejantes al hombre pero por dificultades éticas, de disponibilidad y costo, se limitan los estudios en esta especie. Si bien los modelos no primates tienen algunas limitaciones, su uso ha permitido un avance considerable en el conocimiento de los mecanismos que controlan los niveles de colesterol plasmático en respuesta a la dieta.

Los conejos han sido ampliamente usados para el estudio de la fisiopatología de la aterosclerosis debido a que presentan un metabolismo lipídico muy parecido al humano (Fan y col., 2015), lo que no ocurre con los roedores como la rata o el ratón. Fue el primer modelo animal que se utilizó para estudiar la aterosclerosis hace ya más de cien años; y de hecho, no solo ha brindado muchos conocimientos sobre la patogénesis y el desarrollo de la aterosclerosis humana, sino que también ha hecho una gran contribución a la investigación traslacional (Fan y col., 2015). Considerando que son animales herbívoros, la aterosclerosis no es una patología propia de esta especie. Como consecuencia, son muy sensibles a dietas ricas en colesterol y por lo tanto cantidades relativamente bajas de colesterol en la dieta conducen a hipercolesterolemia y lesiones aórticas (Kolodgie y col., 1996). Estas lesiones comienzan como estrías grasas primariamente en la aorta y pueden progresar hacia lesiones en la capa íntima (Fig. 1).

Jerez y col. (2008) desarrollaron un modelo de hipercolesterolemia generada por una dieta rica en colesterol al 1% administrada a conejos machos durante seis semanas. A nivel vascular se encontraron cambios en la estructura de los vasos sanguíneos compatibles con la aparición de lesiones tempranas, incremento en el espesor de la capa endotelial y disminución del volumen de la capa muscular lisa (Sierra y col., 2015) acompañada de alteraciones en la función vascular. Se observó una disfunción endotelial con reducción en la respuesta vasodilatadora a Ach y en la liberación de NO (Karbiner y col., 2013) con un aumento en la respuesta contráctil a Ang II. El mecanismo de dicho fenómeno involucra la participación de metabolitos vasoconstrictores derivados de la enzima ciclooxigenasa (COX)

y de la citocromo P450 hidroxilasa que actúan sobre los receptores TP de tromboxano A₂ (TXA₂) (Jerez y col., 2008). En trabajos previos Jerez y col. (2005) y otros autores (Baschschmid y col., 2005) han demostrado que las ERO activan la COX y la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores en condiciones fisiopatológicas. Teniendo en cuenta que se encontró incremento del estrés oxidativo en el modelo (Karbiner y col., 2013), este podría ser el mecanismo que origina el proceso de disfunción vascular. A su vez, el modelo se caracterizó por presentar alteraciones hematológicas compatibles con el diagnóstico de anemia hemolítica y evidencia de procesos inflamatorios (Karbiner y col., 2013; Medina y col., 2014).

5- TERAPIAS HIPOCOLESTEROLÉMICAS ACTUALES

Roth y col. (2011) evaluaron la concentración sérica de colesterol, la cobertura farmacéutica y el control terapéutico haciendo uso de los análisis de datos de encuestas nacionales de vigilancia sanitaria procedentes de ocho países de ingresos medios y elevados. Encontraron que el porcentaje de personas con concentraciones elevadas de colesterol sérico total que reciben un tratamiento eficaz sigue siendo bajo en los países estudiados. La hipercolesterolemia sin tratar o tratamientos poco efectivos supone una oportunidad de prevención perdida teniendo en cuenta la epidemia mundial de las ECV (Roth y col., 2011).

Las opciones más comúnmente utilizadas para el tratamiento farmacológico de las dislipidemias son las estatinas (inhibidores de la HMGR), resinas (limitan la absorción intestinal de colesterol), fibratos (agonistas que activan a los proliferadores de los receptores de peroxisomas alfa, PPAR α , y de esta manera reducen la síntesis de TG y de VLDL-C), niacina (inhibidor de lipasa intracelular) y sus combinaciones (Zodda y col., 2018) (Fig. 10).

La proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9) ha sido descrita como una proteína clave en la regulación del metabolismo del colesterol y por tanto se ha convertido en un objetivo terapéutico importante. Su papel se basa en la unión a LDLr, impidiendo su normal reciclaje, lo que se traduce en la disminución de la cantidad de estos receptores en la membrana de los hepatocitos y un aumento de los niveles de LDL-C en sangre. Actualmente están disponibles los inhibidores de PCSK9 y el nuevo inhibidor selectivo de la proteína microsomal de transporte de TG hepática e intestinal (lomitapide) y el inhibidor de la síntesis de apo B-100 (mipomersen, oligonucleótido que se une al ARNm que codifica para apoB) (Zodda y col., 2018).

Sharma y col., (2009) encontraron que las estatinas constituyen el tratamiento médico preferido para la mayoría de los pacientes. Actualmente en los Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado seis medicamentos de esta clase (Nelson, 2013). Los datos comparativos muestran que todos ellos reducen los niveles de lípidos en diversos grados, siendo atorvastatina y rosuvastatina considerados como los reductores "fuertes" de LDL-C.

Aunque las estatinas han logrado ser el tratamiento preferido para la hiperlipidemia y hay quienes consideran que la monoterapia es la mejor opción, otros autores consideran que las combinaciones de medicamentos producen una mejor reducción del LDL-C con menor incidencia de efectos secundarios. Son numerosos los casos en que la terapia con estatinas alcanza dosis superiores a lo recomendable, pero los objetivos de lípidos no logran cumplirse. Finalmente, hay situaciones en las que las estatinas están contraindicadas o no son toleradas (Zodda y col., 2018).

En cuanto a la inhibición específica de la absorción de colesterol, ya sea de origen biliar o dietético, se realiza por la unión de ezetimibe a la NPC1L1, bloqueando la internalización del complejo NPC1L1/colesterol (Hawes y col., 2007). En los seres humanos, ezetimibe disminuye la absorción de colesterol en un 54 % y disminuye la concentración del LDL-C plasmático en un 19 %, pero aumenta su síntesis endógena en un 89 % (Sudhop y col., 2002). Ezetimibe se prescribe en pacientes en los que el tratamiento con estatinas es inadecuado o no tolerado. En monoterapia, ezetimibe mejora la hiperlipidemia posprandial y la disfunción endotelial (Yunoki y col., 2011). Por lo tanto, en la hipercolesterolemia el tratamiento con ezetimibe combinado con estatinas sería muy efectivo por sus efectos aditivos (Sudhop y col., 2009; Zodda y col., 2018). Sin embargo, los resultados de diversos ensayos clínicos en los cuáles se utilizó la terapia combinada fueron contradictorios.

La búsqueda de agentes terapéuticos nuevos, con perfil farmacocinético y farmacodinámico mejorado y de baja toxicidad es la principal necesidad para manejar las complicaciones cardiovasculares. Los productos naturales, tanto en forma de productos farmacéuticos o como nutraceuticos (o alimentos funcionales) son ampliamente aceptados en todo el mundo y son considerados relativamente seguros por la mayor parte de la población (Wildman y col., 2003).

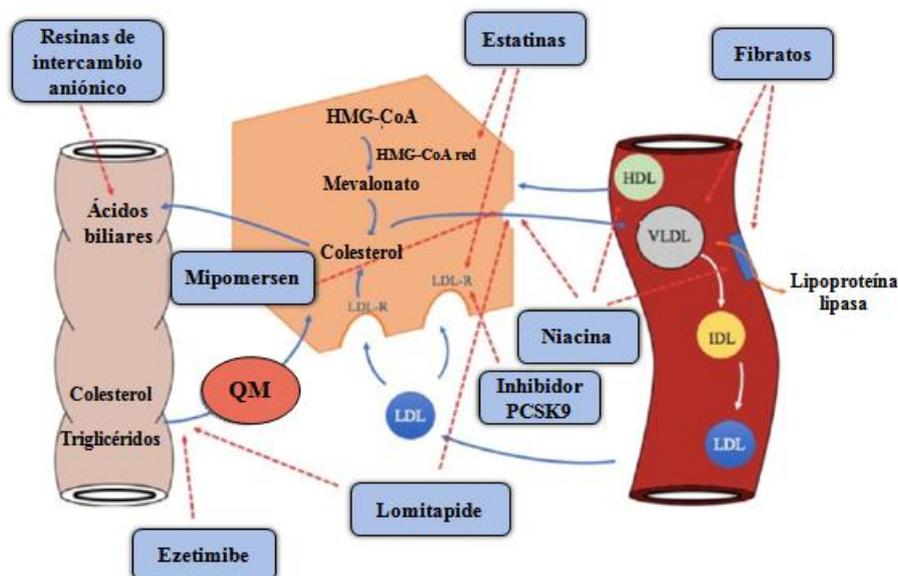


Fig. 10: Mecanismos moleculares de drogas comerciales para el control del metabolismo del colesterol y triglicéridos (modificado de Zodda y col., 2018)

6- COMPUESTOS FENÓLICOS CON PROPIEDADES CARDIOPROTECTORAS

Actualmente, los productos naturales son una fuente importante para la obtención de preparados medicinales (Prakash y col., 2003). Es de gran importancia el desarrollo de nuevos fármacos sintetizados a partir de materias primas naturales y renovables con actividades biológicas específicas (Brodniewicz y Gryniewicz, 2012).

Hay más de 4000 compuestos polifenólicos conocidos y se subdividen en nueve subclases que incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas, flavonoides, isoflavonas, antocianidinas, proantocianidinas, auronas y chalconas, que son considerados sustancias bioactivas que presentan una gran variedad de efectos biológicos, entre ellos, actividades cardioprotectoras prometedoras (Mahatrapa y Bharti, 2016). Su estructura fundamental se caracteriza por la presencia de uno o más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo libre u ocupando otra función (éster, éter, glicósido) (Tsimidou, 1998). Solamente las plantas y microorganismos son capaces de sintetizar el núcleo aromático.

6.1- Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular que se encuentran en frutas, vegetales, nueces, semillas hierbas, especias, flores, así como en el té y en el vino tinto (Middleton y col., 2000). Se encuentran tanto libres como en forma de glucósidos y tienen importantes efectos farmacológicos benéficos para la salud (Prakash y col., 2003).

Presentan una estructura fundamental basada en dos anillos aromáticos (A, B) unidos por una cadena carbonada estructuralmente relacionada al propano. Esta estructura base C6-C3-C6 (Fig. 11), puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, que según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados se clasifican en: chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas, y taninos.

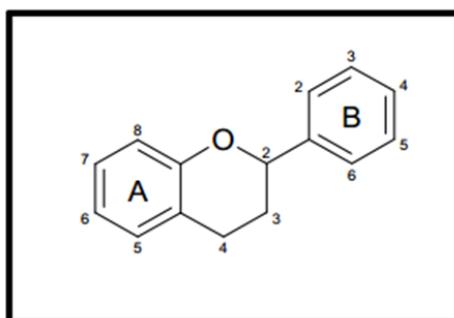
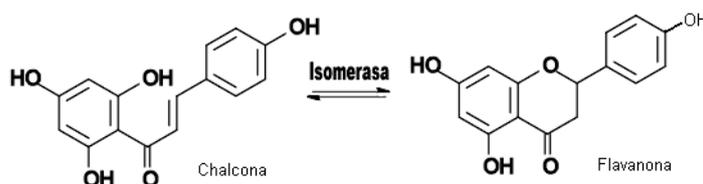
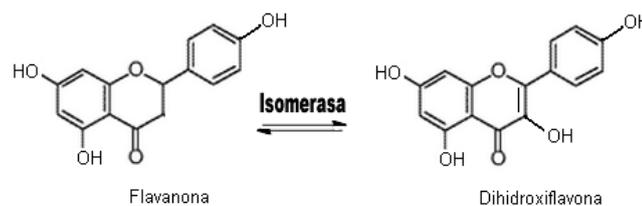


Fig. 11: estructura fundamental de un flavonoide

El primer flavonoide sintetizado por la vía biosintética de los flavonoides es una chalcona cuyo esqueleto es un anillo aromático unido a una cadena propánica que está unida a su vez a otro anillo aromático. En la mayoría de los flavonoides, la cadena carbonada que une los anillos aromáticos se cicla por acción de una enzima isomerasa, creando una flavanona.



Las flavonas derivan de las flavanonas, cuya conversión requiere de las enzimas flavonas sintetasas I y II (Turnbull y col., 2004) que introducen un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo propánico. Una vez insaturada la flavona puede ser hidroxilada, dando lugar a hidroxiflavonas.



Actualmente existe un gran interés por estos compuestos debido a sus propiedades antioxidantes y a sus posibles efectos benéficos en la salud humana, tales como en tratamiento y prevención del cáncer, ECV y otras patologías de carácter inflamatorio (Kumar y Pandey, 2013).

6.2- Papel de los flavonoides en el sistema cardiovascular

Como se mencionó previamente, existe un interés creciente en el uso de flavonoides y compuestos relacionados para la prevención de ECV (Hooper y col., 2008).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxifenólicos. Su gran capacidad antioxidante depende de las propiedades redox de estos grupos y su acción inhibitoria sobre el radical hidroxilo (HO^\cdot) y el anión superóxido (O_2^\cdot), altamente reactivos en la cadena de peroxidación lipídica (Peng, 2003). Sumado a su actividad antioxidante los flavonoides pueden regular diferentes vías de señalización involucradas en el desarrollo de ECV (Wallace, 2011). En este sentido se ha demostrado que los flavonoides incrementan la producción de NO endotelial favoreciendo la vasodilatación de los vasos sanguíneos en condiciones fisiopatológicas tales como hipertensión o síndrome metabólico (Andriantsitohaina y col., 2012).

Algunos autores han encontrado que tienen efectos terapéuticos en la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica (Cheng y col., 2017; Geleijnse y col., 2002). Al neutralizar las ERO del medio evitan la peroxidación lipídica, inhibiendo tanto la peroxidación del ácido linoleico como la de los fosfolípidos de las membranas celulares y de los glóbulos rojos (Laughton y col., 1989). Asimismo, se ha comprobado su capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las LDL-C y reducir la citotoxicidad de las LDL-C oxidadas (Hirano y col., 2001; Terao y col., 2001). Los flavonoides pueden inhibir diversas etapas involucradas en el inicio de la aterosclerosis, el daño endotelial, la activación de leucocitos, y la activación plaquetaria (Beretz y Cazenave, 1988). Adicionalmente se ha propuesto un papel potencial de los flavonoides en reducir la vulnerabilidad del endotelio vascular a los procesos

inflamatorios y oxidativos, ejerciendo una acción protectora del endotelio adicional al incremento de la síntesis de NO (Youdim y col., 2002).

Existen evidencias experimentales y epidemiológicas que sugieren su influencia benéfica en el sistema cardiovascular, como ser una menor incidencia de enfermedad coronaria, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Huxley y Neil, 2003; Perez-Vizcaino y col., 2009). Está bien documentado el efecto de los flavonoides como agentes antihipertensivos por sus efectos como vasodilatadores (Calderone y col., 2004; Edwards y col., 2007).

Estudios recientes demostraron que la ingesta dietética de flavonoides naturales presenta propiedades de protección y moduladoras que reducen el riesgo de progresión aterosclerótica, control de peso, etc. Estos efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular se deben principalmente a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Testai y col., 2013, Loke y col., 2010).

6.3- Chalconas: características y propiedades en el sistema cardiovascular

Como se mencionó, las chalconas pertenecen a la familia de los flavonoides de cadena abierta en el que los dos anillos aromáticos (A y B) se unen mediante un sistema de carbonilos de tres átomos de carbono (Fig. 12). Las chalconas atrajeron la atención de los investigadores debido a su química simple, procedimientos sintéticos fáciles, multiplicidad de sustituciones y diversos potenciales farmacológicos sobre el sistema cardiovascular (Mahapatra y Bharti, 2016); entre ellos podemos mencionar efecto antiarrítmico (Yarishkin y col., 2008); bloqueantes de los receptores α y β -adrenérgicos (Li y col., 2011); antiagregante plaquetario (Zhao y col., 2005); antiinflamatorio (Israf y col., 2007); antioxidante (Aoki y col., 2008); inhibidoras de la enzima convertidora de la angiotensina ([ECA], Kantevari y col., 2011; Bukhari y col., 2013) y de los canales de Ca^{2+} (Dong y col., 2010); e inhibidoras de enzimas proinflamatorias como la COX, fosfolipasa A (sPLA₂) y lipoxigenasa (LOX) (Nuño y col., 2016). Asimismo, se ha encontrado que algunas chalconas tienen un efecto hipolipémico (Sashidhara y col., 2013). El mecanismo de dicho efecto fue la inhibición de enzimas que participan en el metabolismo lipídico, entre ellas, la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP; Hirata y col., 2012), la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT; Tabata y col., 1997), la ACAT (Choi y col., 2008), la lipasa pancreática (LP; Nguyen y col., 2013), o bien la activación de la LPL (Srivastava y col., 2013).

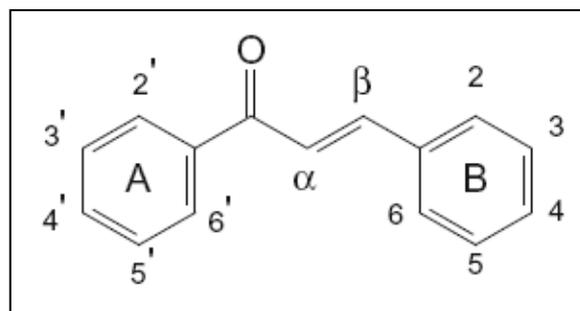


Fig. 12: Estructura de una chalcona (imagen obtenida de Rozmer y Perjési, 2014)

7- *Zuccagnia punctata*

7.1- Clasificación y composición

Zuccagnia punctata Cav. (Fabaceae) (Fig. 13) es una especie endémica argentina, ampliamente distribuida en las zonas áridas y semiáridas del oeste de Argentina desde Jujuy hasta Chubut (Cabrera, 1971).

El uso popular medicinal de las partes aéreas de *Z. punctata* incluye infusiones y decocciones en agua, así como extractos preparados por maceración en etanol (Isla y col., 2016).

La composición química del extracto de las partes aéreas (tallo y hojas) de *Zuccagnia punctata*, varía ligeramente, según el método de extracción usado en su preparación; sin embargo los principales bioconstituyentes descritos en *Z. punctata* pertenecen a compuestos fenólicos, más exactamente, a flavonoides y derivados de ácido cafeico (Isla y col., 2016; Solorzano y col., 2017), siendo las chalconas (2',4'-dihidroxí-3'-metoxichalcona [DHMC] y 2',4'-dihidroxichalcona [DHC]) los principales constituyentes de los extractos preparados a partir de un solvente de extracción acuoso, etanólico, metanólico o diclorometanólico (Zampini y col., 2012; Nuño y col., 2016; Isla y col., 2016). El análisis histoquímico de la superficie foliar de *Z. punctata* revela que existe una elevada concentración de chalconas en esta zona (Moreno y col., 2015a).



Figura 13: Imágenes fotográficas de *Zuccagnia punctata* en la provincia de Tucumán (Isla y col., 2016)

7.2- Propiedades terapéuticas documentadas de *Z. punctata*

En Argentina, un gran número de plantas indígenas están todavía en uso como fuente de terapias a base de hierbas (Ratera y col., 1980), entre ellas *Z. punctata* es utilizada tradicionalmente para el tratamiento de las infecciones bacterianas y fúngicas, asma, artritis y el reumatismo (Ratera y col., 1980; Toursarkissian, 1980). En los últimos años varias investigaciones han sido dirigidas para conocer las propiedades biológicas de esta especie vegetal. Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de *Z. punctata* frente a un amplio rango de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas resistentes a antibióticos (Zampini y col., 2005; Zampini y col., 2012). Por otro lado, se demostró el potencial antioxidante del extracto de esta planta y los flavonoides aislados de la misma relacionados biosintética y estructuralmente (Fig. 14) (2',4',-dihidroxichalcona [DHC], 7-hidroxi flavanona [HF] y 3,7-dihidroxi flavona [DHF]), que tienen capacidad depuradora de radicales libres estables (ABTS y DPPH) y ERO tales como el O_2^- (Morán Vieyra y col., 2009; Zampini y col., 2005). También, se demostró que extractos de *Z. punctata* presentan una potente propiedad citoprotectora sobre la mucosa gástrica de mamíferos (De la Rocha y col., 2003). Recientemente, Moreno y col (2015b) demostraron que estos mismos flavonoides presentan capacidad antiinflamatoria mediada por su efecto inhibitor de la ciclooxigenasa inducible (COX-2). Zampini y col. (2008) demostraron que el extracto hidroalcohólico de *Z. punctata* no presenta efecto genotóxico sobre células de hepatoma humano (HepG2) y protege al ADN contra el daño inducido por la acción directa del compuesto genotóxico 4-nitroquinolina (4-NQO) y que esta capacidad protectora podría estar relacionada a la presencia en el extracto de 2',4'-dihidroxichalcona.

Estas propiedades de *Z. punctata* permiten inferir que tendría un efecto preventivo del daño vascular que se produce debido al estrés oxidativo y los procesos inflamatorios durante la hipercolesterolemia.

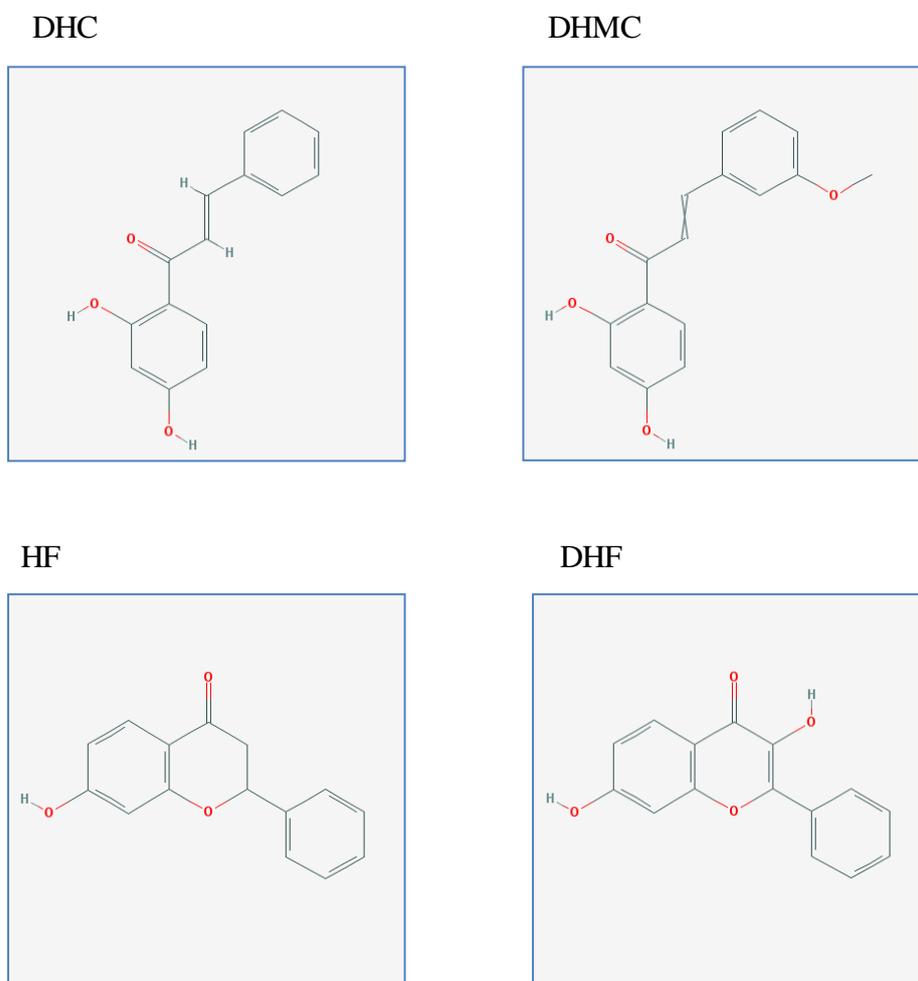


Fig. 14: Principales flavonoides presentes en *Z. punctata*. DHC: 2',4'-dihidroxichalcona, DHMC: 2',4'-dihidroxí-3'-metoxichalcona, HF: 7-hidroxiflavanona, DHF: 3,7-dihidroxiflavanona

8- OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de un extracto hidroalcohólico estandarizado de *Zuccagnia punctata* y sus flavonoides sobre la función vascular en un modelo de conejo con hipercolesterolemia inducida por una dieta rica en colesterol al 1 %.

8.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar en arterias de conejos con hipercolesterolemia el efecto *in vitro* de un extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* y sus flavonoides sobre la función endotelial y del músculo liso.
2. Estudiar el efecto de la administración oral de un extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* en un modelo de conejo con hipercolesterolemia sobre:
 - 2.1. Parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos.
 - 2.2. Parámetros del estrés oxidativo.
 - 2.3. Función vascular.
 - 2.4. Alteraciones morfohistológicas en aortas aisladas.

9- HIPÓTESIS

El extracto de *Z. punctata* y/o sus flavonoides previenen la disfunción vascular observada en la hipercolesterolemia. Debido a sus propiedades antioxidantes, estos productos naturales mejoran los parámetros de estrés oxidativo, y por su propiedad antiinflamatoria previenen el incremento de la respuesta contráctil a Ang II, protegiendo las arterias de los cambios deletéreos generados por esta hormona y la desaparición o atenuación de los cambios morfológicos vasculares.

10-RELEVANCIA

El estudio del efecto del extracto de *Z. punctata* y sus flavonoides sobre la función vascular aporta, no solo el respaldo científico al uso folclórico de las plantas de nuestro país sino que supone un avance al conocimiento para el posterior uso de los mismos en la industria farmacéutica, con especial énfasis en el desarrollo regional.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

1- MATERIALES

1.1- Material Vegetal

Las partes aéreas (hojas y tallos) de *Z. punctata* fueron recolectadas en Amaicha del Valle, Tucumán, Argentina. Las campañas de recolección se realizaron en 2014, durante la época estival. Las muestras se secaron en un lugar oscuro a temperatura ambiente. Los especímenes fueron autenticados por la Dra. Soledad Cuello y archivados en el Departamento de Botánica de la Fundación Miguel Lillo (IML 605935).

1.1.1- Elaboración y estandarización del extracto de *Zuccagnia punctata*

Se preparó el extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (ZpE) según las recomendaciones de la Farmacopea Argentina 7a ed (Fig. 15). Se pesó 20 g de material vegetal seco y se maceró en 100 ml de etanol: agua (80: 20) durante 7 días con agitación (40 ciclos/min) a temperatura ambiente. El extracto se filtró a través de papel de filtro No. 4.

Para la estandarización se tuvo en cuenta las directrices de la Agencia Europea de Medicina (EMA, 2010) y las recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de drogas o preparados vegetales de la ANMAT, por lo cual se estandarizó desde el punto de vista químico de acuerdo al contenido de marcadores activos (aquellos con actividad terapéutica conocida). Además se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999) expresándose los resultados como mg de equivalentes en ácido gálico/g de extracto seco (mg EAG/g ZpE seco) y como mg EAG/ml. El contenido de compuestos fenólicos no flavonoides (CFNF) y flavonoides (CFF) fue determinado según Isla y col. (2014) expresándose los resultados como mg EAG/g ZpE seco. A continuación, se eliminó el solvente con un evaporador rotatorio a presión reducida y se obtuvo el extracto seco de *Z. punctata*, resuspendido en dimetilsulfóxido (DMSO) antes de su uso (ZpE).

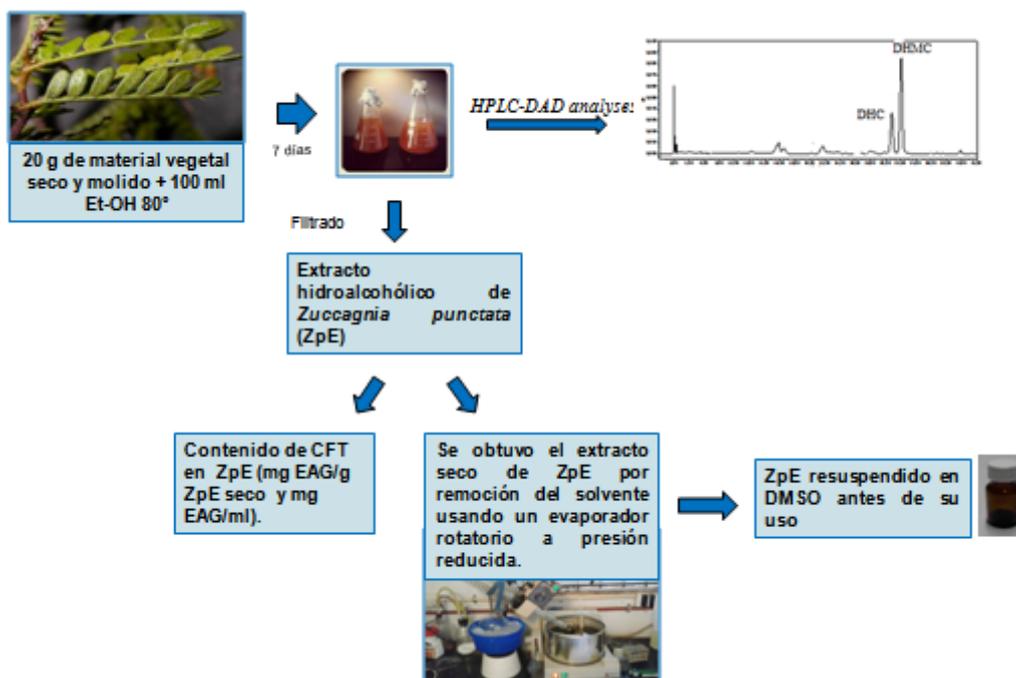


Fig. 15: Elaboración y estandarización del extracto hidroalcohólico de *Z. punctata*

1.1.2- Separación e identificación de los principios activos

El extracto hidroalcohólico de *Z. punctata* se analizó por HPLC unido a un detector de matriz de diodos (DAD). El sistema de HPLC utilizado para el análisis DAD fue un equipamiento Waters (Water Corporation, Milford, Massachusetts) que consistía en una bomba binaria 1525, un detector de matriz de diodos UV 2998, una columna C18 Waters X-bridge (150 x 4,6 mm d.i; 4,6 μ m). Los análisis de HPLC-DAD se realizaron usando un sistema de solvente en gradiente lineal que consistió en 9 % de ácido acético en agua (A) y metanol (B) de la siguiente manera: 25 a 45 % B durante 10 minutos, seguido por 45 % B 10 - 20 min, 45 % a 70 % B 20 - 40 min, 70 % a 75 % B 40 - 50 min, 75 % a 100 % B 50 - 55 min. La detección fue en UV a 280 nm. El caudal fue de 0,8 ml/min y se inyectó un volumen de 20 μ l. Los compuestos se controlaron a 280, 320 y 350 nm y se registraron espectros UV de 200 a 600 nm para la caracterización de los picos observados. Se utilizó el software Empower 2TM. Para identificar y cuantificar los principales flavonoides se utilizaron los espectros UV y coinyección con estándares comerciales de DHMC, DHC, DHF y HF. Se preparó una curva de calibración utilizando estándares comerciales para determinar la relación entre el área del pico y la concentración de los compuestos que se expresó como mg/g de ZpE seco.

1.2- Animales experimentales y dietas

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 8ª ed.* (Publicaciones NIH No. 8023, revisada en 1978). Los protocolos experimentales para este estudio fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina).

Se adquirieron conejos machos híbridos del departamento cunicula de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Los animales (900-1000 g) se alojaron en el bioterio Anexo del INSIBIO en jaulas individuales, a temperatura (25° C) y condiciones controladas con un ciclo constante de luz/oscuridad de 12 h.

1.2.1- Elaboración de la dieta rica en colesterol (DH)

Se usó el modelo de hipercolesterolemia caracterizado por Jerez y col. (2008). El alimento enriquecido en colesterol al 1 % (dieta hipercolesterolémica, DH) fue preparado de la siguiente manera: 1000 g del alimento balanceado (GANAVE, Rosario, Argentina) se humedeció hasta formar una pasta. Se adicionó 10 g de colesterol (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) y se mezcló hasta lograr una pasta homogénea. A los fines de lograr aglutinar todos los ingredientes, se agregó 100 g de almidón de maíz. Luego se procedió a formar los pellets manualmente. Para eliminar el exceso de humedad, se llevaron los pellets a microondas durante tres minutos, y luego 15-20 minutos en horno eléctrico.

2- TÉCNICAS

2.1- Reactividad Vascular

El efecto farmacológico o respuesta biológica posterior a la interacción droga-receptor en los vasos sanguíneos, es susceptible de medición.

2.1.1- Sistema de registro de contractilidad isométrica en aorta torácica

El ensayo de baño de órgano aislado es una herramienta farmacológica clásica para evaluar la relación concentración-respuesta de una amplia gama de agonistas contráctiles y relajantes en el tejido vascular. Si bien esta técnica se implementó hace más de 100 años, la versatilidad, simplicidad y reproducibilidad de los resultados contribuyen a que siga siendo una herramienta indispensable tanto para farmacólogos como para fisiólogos (Jespersen y col., 2015). Esta herramienta nos permite el conocimiento exacto de la respuesta dependiente de la concentración del fármaco y la eliminación de las respuestas de carácter reflejo (neuronal) o de retroalimentación humoral.

El sistema de registro (Fig. 16) consta dos cámaras de acrílico con una capacidad de 10 ml inmersas en un baño termostatzado (Vicking, Argentina) a 37 ± 1 °C. Estas cámaras contienen solución fisiológica de Krebs con burbujeo de gas carbógeno (95% O₂ - 5% de CO₂). Cada una de las cámaras cuenta con un sistema de dos “L” metálicas, una de posición fija, y otra móvil conectada al transductor de fuerza-desplazamiento (Grass Instrument CO., Force-Displacement Transducer FT03, USA), el cual a su vez se conecta a un sistema de adquisición de datos con un software apropiado (Biopac System, Inc. MP 100, USA) y que permite el registro continuo de la respuesta contráctil.

Antes del inicio de cada ensayo, se procedió a la calibración de los transductores de fuerza, usando pesas de 10 g, para establecer la relación entre la entrada de datos y el registro de tensión obtenido. Una vez finalizada la calibración se usaron pesas de 0,5 -1- 2 g a los fines de verificar el correcto funcionamiento de cada uno de los transductores (linealidad).

2.1.2- Registro de contracciones

Posterior al sacrificio, se disecó la porción torácica de la arteria aorta. Se limpió el tejido conectivo y se seccionó en anillos de 5 mm. Para registrar las contracciones isométricas, se montaron los anillos aórticos en un sistema de dos “L”. De esta forma, la “L” móvil conectada al transductor de fuerza-desplazamiento, lleva la señal hasta el módulo amplificador-acondicionador de la señal del Biopac System MP100. Finalmente, la señal fue digitalizada.

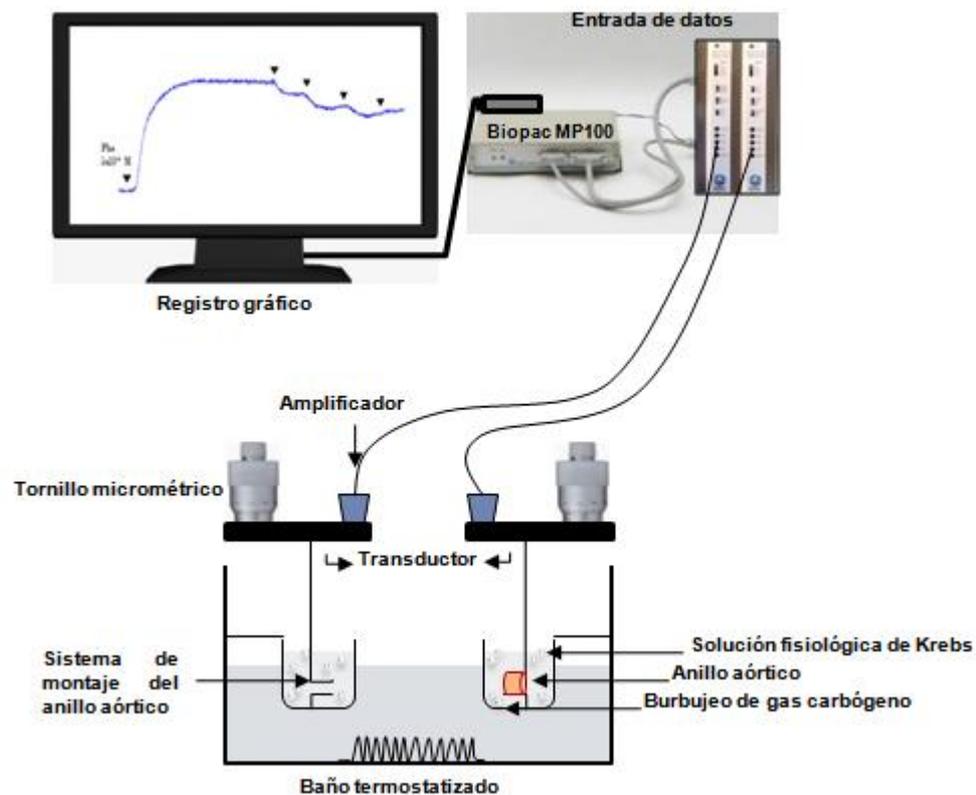


Fig. 16: Sistema de registro de contractilidad isométrica

Los anillos aórticos se equilibraron a tensión de 2 g durante 120 minutos. Para tensar la arteria es necesario realizar un estiramiento de la misma, lo cual se logra mediante tornillos micrométricos conectados al transductor y a la “L” móvil. El MLV tiene una respuesta de relajación frente al estiramiento, por lo tanto cada 15 minutos se practicó un cambio de baño de la solución de Krebs y se tensó nuevamente la arteria a 2 g. Transcurrida las dos horas, se obtuvo un nivel de tensión basal estable, lo cual se refleja por el cese de la relajación espontánea. El valor de tensión óptimo varía según el vaso y la especie estudiada (Jespersen y col., 2015). En este caso, en trabajos previos realizados por nuestro grupo se comprobó que la aorta de conejo tiene una respuesta contráctil/relajante óptima a una tensión de 2 g.

2.1.3- Curva Concentración Respuesta (CCR)

Es un elemento clave en los estudios farmacológicos, ya que permite cuantificar la interacción hormona-receptor, posibilitando el cálculo de dos parámetros farmacológicos fundamentales para caracterizar la respuesta de una droga:

- *Respuesta máxima ($R_{m\acute{a}x}$):* describe la intensidad de la respuesta causada por el fármaco (actividad intrínseca de la hormona o eficacia). Se considera el efecto máximo obtenido con la droga en concentraciones saturantes del receptor.
- *EC_{50} :* se define como la concentración de un agonista necesaria para alcanzar la mitad de la $R_{m\acute{a}x}$. Esta variable es importante porque permite determinar la afinidad o sensibilidad del agonista por su receptor.

Una CCR (Fig. 17) se logra agregando de manera sucesiva, concentraciones crecientes del agonista vasodilatador o vasoconstrictor al baño de órgano en el que se encuentra el anillo aórtico. Estas concentraciones progresivas se agregan sin retirar las concentraciones precedentes del medio. Se comienza con concentraciones bajas en las que no se detecta respuesta alguna, y al aumentar la concentración se observa vasoconstricción o vasodilatación, según el agonista usado. Se espera que la curva se desarrolle y cuando alcanza una meseta se agrega nuevamente el agonista pero a una concentración sucesiva más elevada. Esto se repite hasta que la respuesta llega a una meseta que no se modifica ante el agregado de concentraciones mayores. En este momento se dice que la curva ha alcanzado la $R_{m\acute{a}x}$.

Para calcular las constantes farmacológicas $R_{m\acute{a}x}$ y EC_{50} , se realizó un ajuste de los datos a la función sigmoidea con un programa estadístico-graficador: Prism 3.0 (Graph Pad). Se trabajó con el pEC_{50} , definido como el logaritmo negativo de EC_{50} .

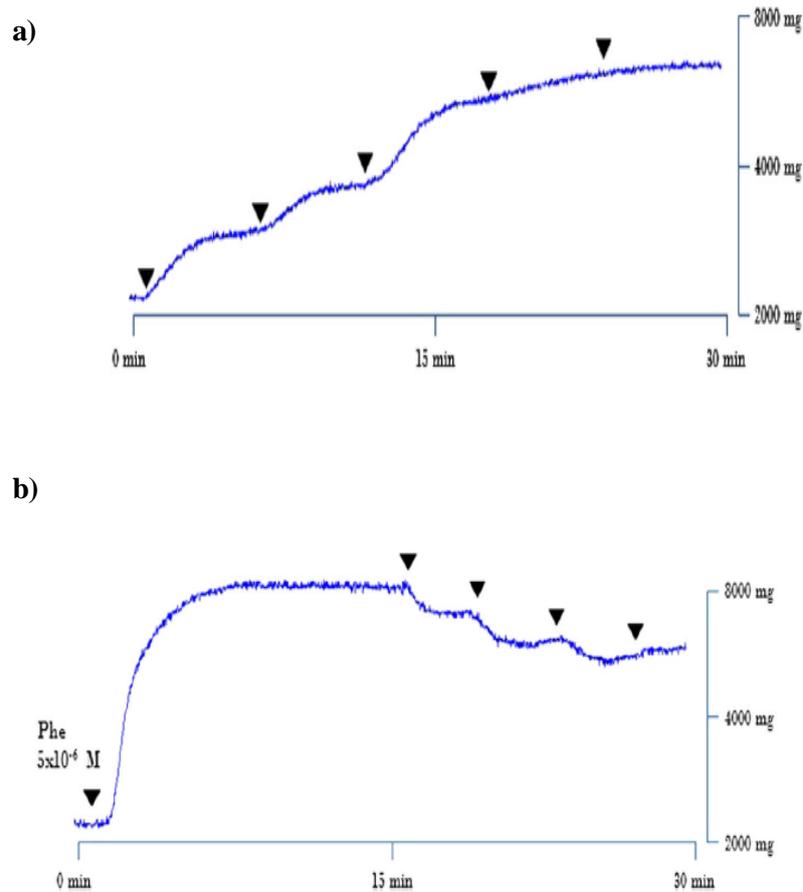


Fig. 17: a) Imagen digitalizada de CCR a la angiotensina II en anillos aórticos de conejos con DH; b) Imagen digitalizada de CCR a la acetilcolina en anillos aórticos de conejos con DH.

2.1.4- Estimulación única

Se estimula al anillo aórtico agregando una única concentración del agonista en estudio (Fig 18).

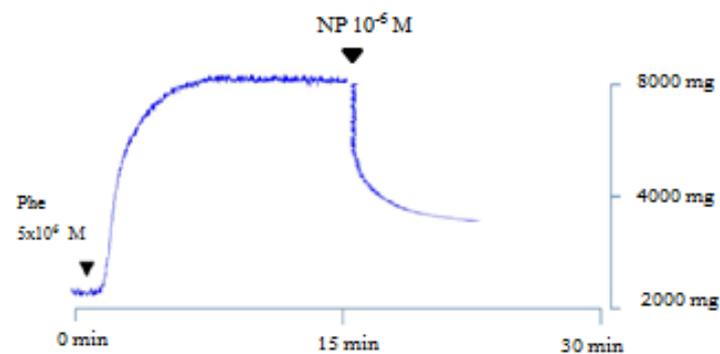


Fig 18: Ejemplo de estimulación única con el agonista contráctil fenilefrina (Phe) 5×10^{-6} M seguida de una estimulación única al vasodilatador independiente de endotelio nitroprusiato de sodio (NP) 10^{-6} M.

2.1.5- Solución fisiológica de Krebs

Para el baño de órgano aislado, se preparó solución fisiológica de Krebs (pH 7,2) con la siguiente composición (mM): NaCl 128; KCl 4,7; NaHCO₃ 14,4; NaH₂PO₄ 1,2; MgCl₂ 1,2; Na₂-EDTA 0,1; CaCl₂ 2,5; Glucosa 11,1.

2.1.6- Drogas usadas

Se prepararon solución madre de Ang II humana 10⁻² M, Phe 10⁻² M, Ach 10⁻³ M, NA 10⁻¹ M y NP 10⁻² M. Todas las drogas fueron adquiridas de Sigma Chemical Co (St Louis; USA) y se solubilizaron en agua destilada. DHC, HF y DHF fueron adquiridos de Indofine Chemicals Company (USA). La solución madre del ZpE y los flavonoides (DHC, HF y DHF) se solubilizaron en DMSO. Todas las soluciones madres se conservaron a -20 °C, y a partir de éstas se prepararon diariamente las diluciones necesarias en agua destilada.

2.2- Parámetros bioquímicos y clínicos

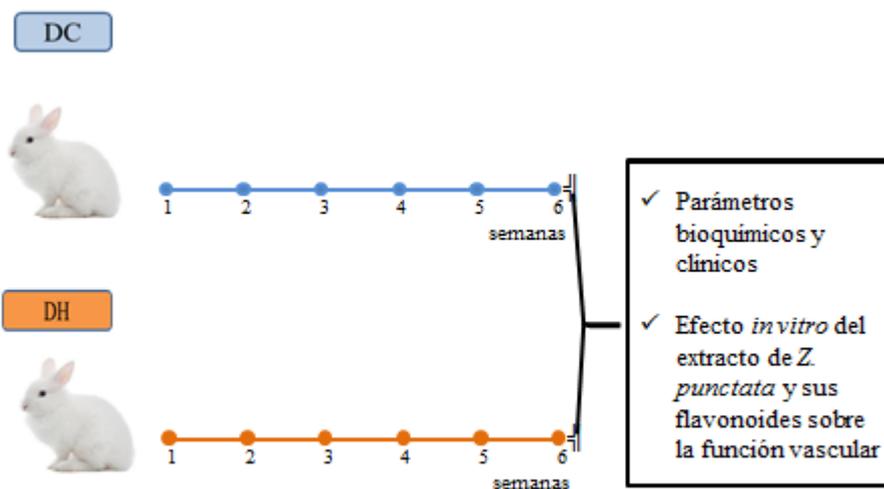
Previo al sacrificio de los animales experimentales, se realizó controles de peso de conejos con dieta control (DC) y DH, y a partir de un catéter conectado a la arteria carótida, se recogieron muestras de suero para las determinaciones bioquímicas: se realizó lipidograma (colesterol total [CT], HDL-C, LDL-C y TG) que fueron medidos mediante kits comerciales (Wiener, Rosario, Argentina) que emplean métodos enzimáticos colorimétricos. Para los ensayos *in vivo* se realizaron además otras determinaciones bioquímicas descritas en la sección 3.2.1.2.1

3- METODOLOGÍA

3.1- Ensayos *in vitro*

Después de un período de aclimatación de una semana, los animales experimentales se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Conejos alimentados con dieta control (DC, n = 12) correspondientes a una dieta estándar de mantenimiento adecuada para un conejo (GANAVE, Rosario, Argentina) y conejos alimentados con DH (n = 12) se alimentó con una dieta enriquecida en colesterol al 1% (detalle pag. 29). Ambos grupos recibieron 150 g de alimento

por día. (Sigma chemical, St Louis, EE. UU). El período de alimentación fue de 6 semanas, con acceso *ad libitum* a fuente de agua. El peso de los animales fue controlado diariamente y el sacrificio se realizó una vez transcurridas las 6 semanas de tratamiento dietario.



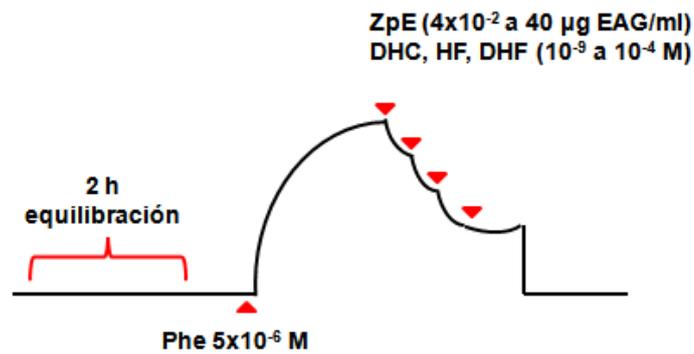
3.1.1- Parámetros bioquímicos y clínicos

Una vez finalizado el período de tratamiento, se realizaron las determinaciones bioquímicas y clínicas a los conejos con DC y DH (de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.) a los fines de verificar la correcta reproducibilidad del modelo hipercolesterolémico para garantizar que los ensayos *in vitro* de función vascular se realizaron efectivamente con arterias aórtas de conejos correctamente modelizados.

3.1.2- Efecto del extracto de *Zuccagnia punctata* y sus flavonoides sobre la función vascular: Protocolos experimentales de reactividad vascular

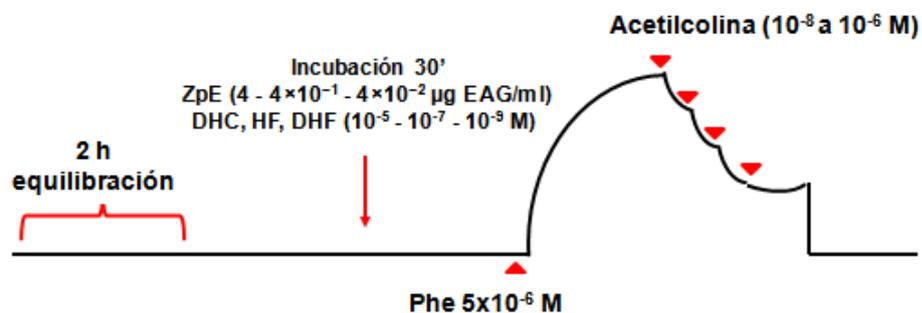
3.1.2.1- Efecto vasodilatador

Se evaluó el efecto vasodilatador del ZpE y sus flavonoides por medio de una CCR al ZpE (rango de 4×10^{-2} a $40 \mu\text{g}$ EAG/ml), DHC, HF o DHF (rango de 10^{-9} a 10^{-4} M) en anillos aórticos de conejos con DC y DH precontraídos con Phe 5×10^{-6} M. El grupo sin tratamiento se incubó con el vehículo (DMSO 1/100).



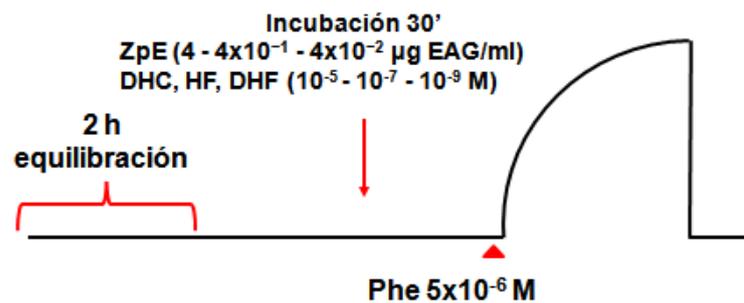
3.1.2.2- Efecto sobre la función endotelial

La correcta funcionalidad del endotelio vascular se estudia mediante la observación de la respuesta a la Ach debido a que este neurotransmisor es dependiente de la presencia de un endotelio funcional para manifestar una respuesta vasodilatadora. En decir, en caso de un endotelio disfuncional, no manifiesta efecto vasodilatador. Por esto, se evaluó la función endotelial a través de CCR a acetilcolina (Ach) en anillos aórticos de conejos con DC y DH precontraídas con Phe 5×10^{-6} M, en presencia de distintas concentraciones del ZpE ($4 - 4 \times 10^{-1} - 4 \times 10^{-2} \mu\text{g EAG/ml}$) y los flavonoides DHC, HF o DHF ($10^{-5} - 10^{-7} - 10^{-9}$ M). Estas incubaciones se realizaron 30 minutos antes de estimular a la arteria con una estimulación única de Phe. El grupo sin tratamiento se incubó con el vehículo.



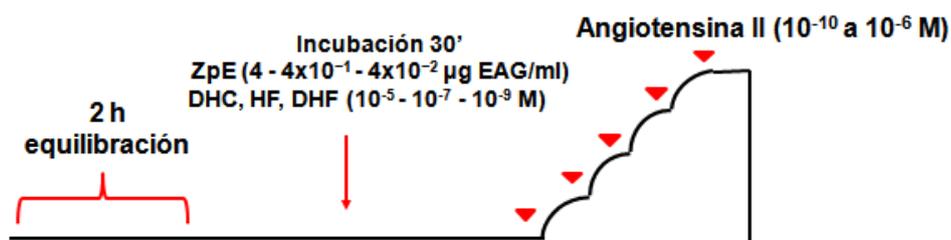
3.1.2.3- Efecto sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones del ZpE ($4 - 4 \times 10^{-1} - 4 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ EAG/ml) y los flavonoides DHC, HF o DHF ($10^{-5} - 10^{-7} - 10^{-9} \text{ M}$) sobre la respuesta contráctil a la Phe en anillos aórticos de conejos con DC y DH. Las incubaciones se realizaron 30 minutos antes de estimular a la arteria con una estimulación única de Phe $5 \times 10^{-6} \text{ M}$. El grupo sin tratamiento se incubó con el vehículo.



3.1.2.4- Efecto sobre la respuesta contráctil a angiotensina II

Se evaluó la respuesta al agonista contráctil angiotensina II (Ang II) a través de una CCR en presencia de distintas concentraciones del ZpE ($4 - 4 \times 10^{-1} - 4 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ EAG/ml) y los flavonoides DHC, HF o DHF ($10^{-5} - 10^{-7} - 10^{-9} \text{ M}$) en anillos aórticos de conejos con DC y DH. El grupo sin tratamiento se incubó con el vehículo. Las incubaciones se realizaron 30 minutos antes de comenzar la estimulación con Ang II.



3.2- Ensayos *in vivo*

3.2.1- PARTE I: Efecto de la administración oral del extracto de *Zuccagnia punctata* en conejos controles – Ensayos de toxicidad y Estudio de Rango de Dosis

3.2.1.1- Ensayo de toxicidad aguda: Administración oral de 250 mg EAG/ml del extracto de *Zuccagnia punctata*

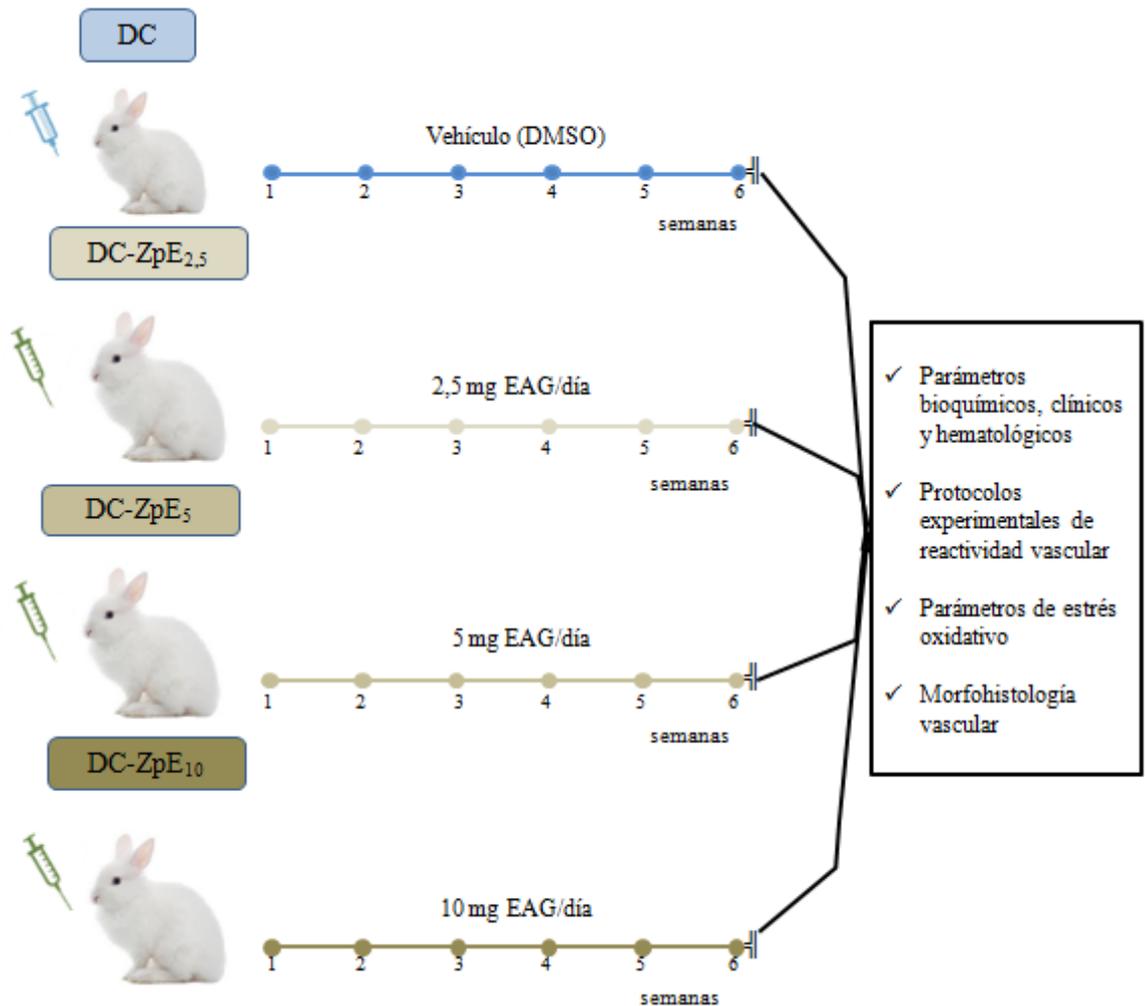
Conejos machos adultos (2 kg de peso) recibieron una dosis única del ZpE de 250 mg EAG/ml. Los animales se observaron continuamente durante la primera hora; y luego cada hora durante las 6 h, a las 12 h y las 24 h para evaluar cualquier signo físico de toxicidad como contorsiones, boqueadas, salivación, diarrea, cianosis y cualquier manifestación nerviosa o mortalidad. Transcurridas las 24 h se procedió al sacrificio y a la toma de muestras de sangre.

Se evaluó la actividad de enzimas hepáticas glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT), como así también los niveles de bilirrubina y creatinina en sangre para evaluar el posible efecto nefrotóxico y hepatotóxico de los tratamientos. Asimismo, se observó aspecto y peso de hígado, riñón y corazón.

3.2.1.2- Ensayo de toxicidad crónica y estudio de rango de dosis: Administración oral de 2,5 – 5 – 10 mg EAG/día del extracto de *Zuccagnia punctata*

Grupos experimentales: conejos alimentados con DC fueron asignados aleatoriamente a los siguientes grupos:

1. **DC:** conejos alimentados con dieta control + vehículo (DMSO 1/100)
2. **DC-ZpE_{2,5}:** DC + 2,5 mg EAG/día ZpE (*equivalente a 1,9 mg EAG/kg de peso/día*)
3. **DC-ZpE₅:** DC + 5 mg EAG/día ZpE (*equivalente a 3,7 mg EAG/kg de peso/día*)
4. **DC-ZpE₁₀:** DC + 10 mg EAG/día ZpE (*equivalente a 7,5 mg EAG/kg de peso/día*)



Los animales fueron tratados durante un período de 6 semanas con provisión de agua *ad libitum* y mantenidos bajo condiciones de luz y temperatura controladas en un bioterio perteneciente al INSIBIO, tal como fue descrito previamente en la sección 1.2. El ZpE se resuspendió en dimetilsulfóxido/agua (1:100) (DMSO, Sigma, EE. UU.) y se les administró vía oral 1,5 - 3 - 6 ml a los conejos de los grupos 2,5 - 5 - 10 mg EAG/día, respectivamente; entre las 7-8 a.m. diariamente y en condiciones de ayuno. Cabe destacar que la DC fue suministrada durante todo el tratamiento de forma concomitante con la administración oral diaria de ZpE. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se procedió de la siguiente manera:

3.2.1.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos

Los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 h y con provisión de agua *ad libitum*. Luego fueron anestesiados con Ketamina (75 mg/kg de peso) y diazepam (1 mg/kg de peso) y se

procedió a la medición de la presión arterial media (PAM) por método directo. Para ello, se localizó el paquete vasculonervioso del cuello y se canuló la arteria carótida con un catéter P40 heparinizado, el cual se conectó a un manómetro junto a un transductor de presión arterial (Gold, USA).

A partir del catéter conectado a la arteria carótida, se recogieron muestras de suero para las determinaciones bioquímicas: glucosa basal, lipidograma (CT y TG), creatinina, GOT, GPT, bilirrubina (total, directa e indirecta) que fueron medidos mediante kits comerciales (Wiener, Rosario, Argentina) que emplean métodos enzimáticos colorimétricos.

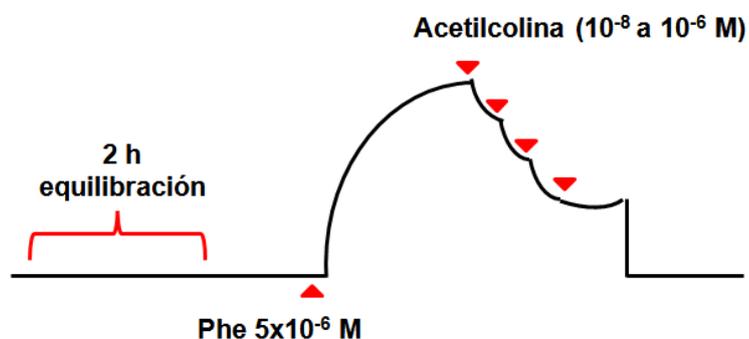
También se evaluó el peso corporal y el peso de órganos (hígado, riñón y corazón). Se tuvo en cuenta los parámetros hematológicos hematocrito (Hto) y número de leucocitos (conteo mediante cámara Fuchs Rosenthal).

3.2.1.2.2- Efecto de sobre la función vascular: Protocolos experimentales de reactividad vascular

Las aortas torácicas de todos los animales pertenecientes a los 4 grupos fueron disecadas, y se realizaron ensayos de contractilidad isométrica para evaluar:

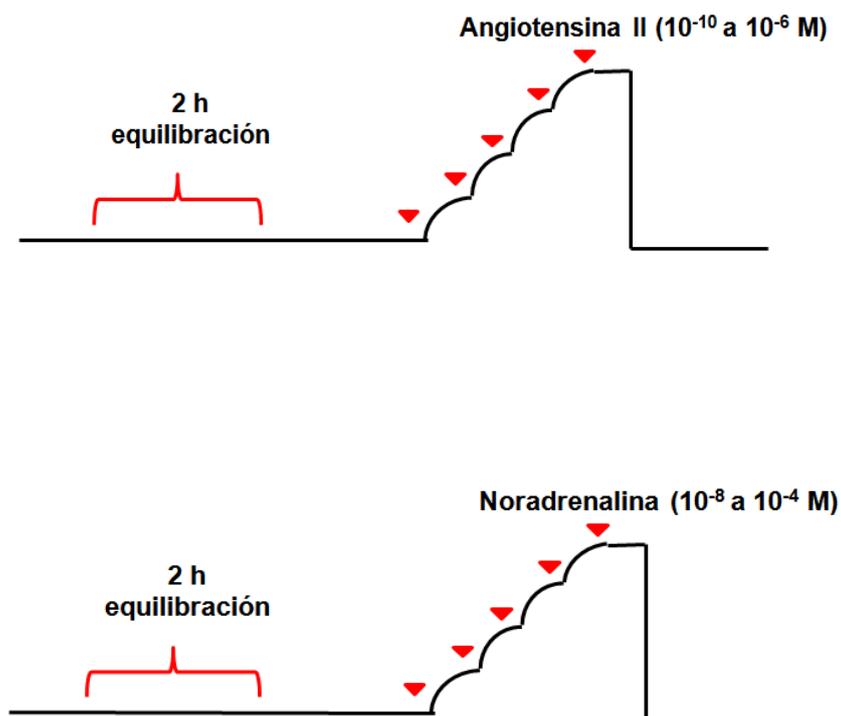
3.2.1.2.2.1- Efecto sobre la función endotelial

Se evaluó la función endotelial a través de CCR a Ach en arterias de conejos con DC administrados con el vehículo o con diferentes dosis del ZpE (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día).



3.2.1.2.2.- Efecto sobre la reactividad del músculo liso

Se evaluó la reactividad del MLV en arterias de conejos con DC administrados con el vehículo o con diferentes dosis del ZpE (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día) por medio de CCR a los agonistas contráctiles Ang II (10^{-10} a 10^{-6} M) y NA (10^{-8} - 10^{-4} M).

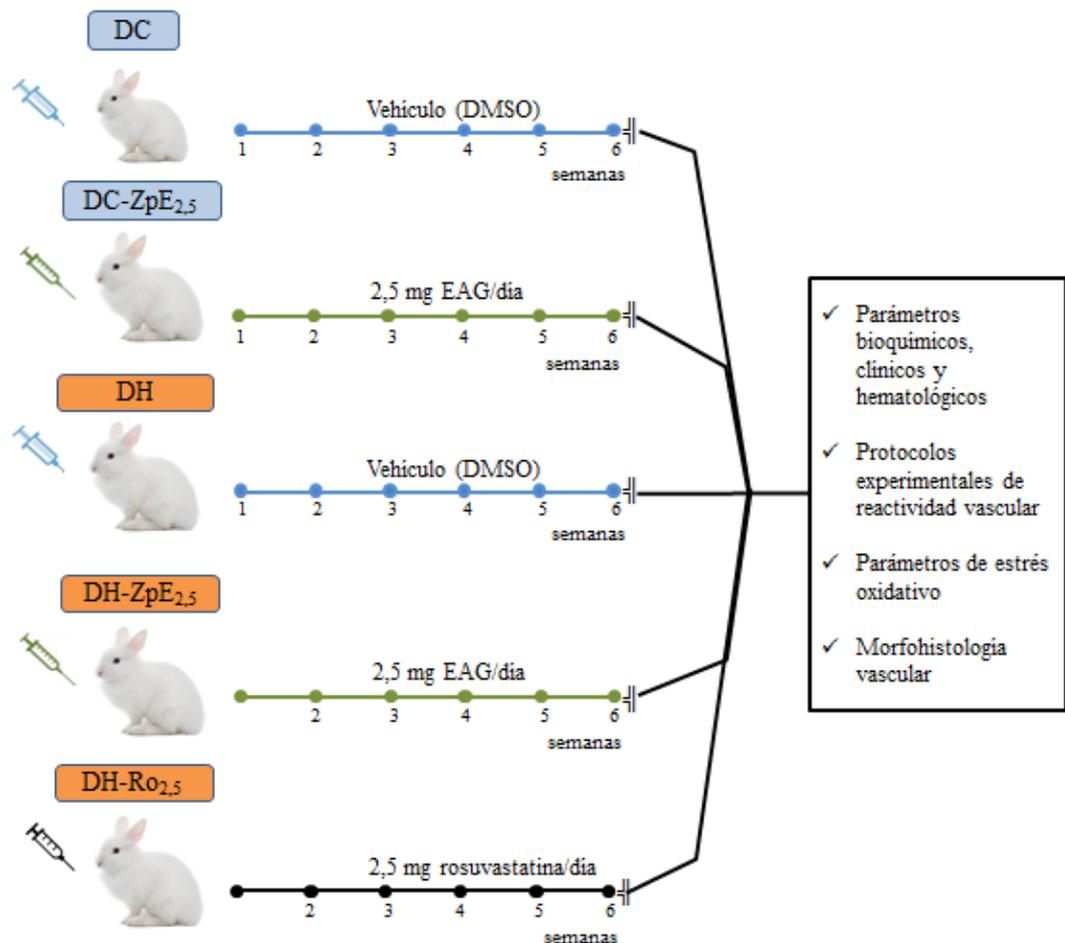


3.2.2- PARTE II: Efecto de la administración oral de 2,5 mg EAG/día del extracto de *Zuccagnia punctata* en conejos alimentados con una dieta enriquecida en colesterol al 1 %

Los resultados de la *Parte I - Estudio de rango de dosis* (Tabla 6) muestran que 2,5 mg EAG/día es la única dosis del ZpE que redujo -de manera sorprendente- el CT (en conejos normocolesterolémicos) y que no modifica los parámetros hepáticos, renales o hematológicos. Por estas razones, se seleccionó la dosis 2,5 mg EAG/día del ZpE para estudiar el efecto del mismo en conejos hipercolesterolémicos.

30 conejos fueron aleatoriamente asignados a los siguientes grupos (n=6 para cada grupo):

1. **DC:** conejos alimentados con dieta control + vehículo (DMSO 1/100)
2. **DC-ZpE_{2,5}:** DC + 2,5 mg EAG/día ZpE (*equivalente a 1,9 mg EAG/kg de peso/día*)
3. **DH:** conejos alimentados con dieta enriquecida en colesterol al 1% + vehículo (DMSO 1/100)
4. **DH-ZpE_{2,5}:** DH + 2,5 mg EAG/día ZpE (*equivalente a 1,9 mg EAG/kg de peso/día*)
5. **DH-Ro_{2,5}:** DH + 2,5 mg rosuvastatina/día (*equivalente a 1,9 mg EAG/kg de peso/día*)



Los animales fueron tratados durante un periodo de 6 semanas con provisión de agua *ad libitum* y mantenidos bajo condiciones de luz y temperatura controladas en un bioterio perteneciente al INSIBIO. El vehículo, el ZpE o rosuvastatina, fueron administrados diariamente vía oral entre las 7-8 a.m. y en condiciones de ayuno. Cabe destacar que la DC y DH fueron suministradas durante todo el tratamiento de forma concomitante con la administración oral diaria de ZpE y rosuvastatina (Ro). Transcurrido el tiempo de tratamiento, se procedió de la siguiente manera:

3.2.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos

Los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 h y con provisión de agua *ad libitum*. Finalmente se procedió según lo descrito en sección 3.2.1.2.1

3.2.2.2- Efecto sobre la función vascular: Protocolos experimentales de reactividad vascular

Las aortas torácicas de los fueron disecadas, y se realizaron ensayos de contractilidad isométrica empleando los protocolos experimentales descritos en la sección 3.2.1.2.2. También se evaluó la respuesta nitroprusiato de sodio (NP, 10^{-6} M) vasodilatador independiente de endotelio, tal como se muestra en la sección 2.1.4.

3.2.2.3- Efecto sobre parámetros de estrés oxidativo

3.2.2.3.1- TBARS: La peroxidación lipídica se evaluó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en suero: se tomó una alícuota de suero y se mezcló con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (1:2) para lograr precipitar las proteínas séricas. La mezcla se centrifugó (15 min; 10 000 rpm; 4° C) y se agregó ácido tiobarbitúrico (TBA) al sobrenadante (1:1). La mezcla se incubó 40 min a 95°C. Luego se enfrió en un baño de hielo, y la absorbancia fue medida a 532 nm. Se calcularon los niveles de peroxidación lipídica en términos de formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteínas) a partir de una curva de calibración realizada con tetrametoxipropano. Las proteínas se determinaron por método de Lowry.

3.2.2.3.2- GSH/GSSG: Cuantificación de la relación glutatión reducido (GSH)/glutatión oxidado (GSSG) en suero: se tomó una alícuota de suero y se precipitaron las proteínas séricas añadiendo TCA 10 % (1:2). La mezcla se centrifugó (15 min; 10 000 rpm; 4°C). Para cuantificar GSH, el sobrenadante se incubó a 30°C (10 min) con 6 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y se midió la absorbancia a 412 nm. Para determinar los niveles de glutatión total (GT), el sobrenadante se incubó a 30° C (2 min) con 6 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y 0,3 mM NADPH; luego se añadió glutatión reductasa (0,04 U) y la mezcla se incubó a 30° C (10 min) y la absorbancia se midió a 412 nm.

El GSH y GT se calcularon utilizando una curva estándar de GSH. El GSSG se calculó como $\text{GSSG} = \text{GT} - \text{GSH}$. Los resultados se expresan como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, según lo determinado por el método de Lowry.

3.2.2.4- Efecto sobre la morfohistología vascular

El cayado aórtico y una porción proximal de la arteria aorta de conejos de los 5 grupos (DC y DH con o sin tratamiento con ZpE y Ro) fueron fijados en formol al 10 % (pH 7,4). Se realizó:

3.2.2.4.1- Histometría: Se trabajó con el anillo (5 mm de longitud) correspondiente a la primera porción de la aorta torácica consecutiva al cayado aórtico. Al cabo de 48 h en formol tamponado, los anillos aórtico fueron deshidratados progresivamente en alcohol 70° (1 h), 80° (40 min), 96° (40 min), dos baños sucesivos de 100° (1 h), dos baños sucesivos de Xilol (1 h). Finalmente se dejó en la estufa en baño de parafina (24 h). Se realizó un nuevo baño de parafina (2 h) en estufa y se procedió a la inclusión del tejido y el armado del taco. Luego se realizaron cortes (5µm) aislados y seriados con un micrótopo de deslizamiento (Reichert, USA). Se aplicó la técnica de tinción hematoxilina-eosina (H-E). Para la observación, análisis e interpretación de imágenes, se tomaron microfotografías de los cortes histológicos utilizando una cámara digital AxioCam HRc incorporada a un microscopio Zeiss Imager A2. Las imágenes fueron captadas usando un software Axio Vision Release 4.8.2 con aumentos de 40 x. Se realizaron los estudios de histometría mediante técnicas estereológicas evaluando la relación íntima/media (razón entre la longitud del endotelio [E] y el MLV) de la arteria aorta por morfometría digital con el programa Media Cybernetics® Image-Pro Plus™.

3.2.2.4.2- Porcentaje de área sudanofílica: Se trabajó con los cayados aórticos completos para la coloración macroscópica de los depósitos lipídicos en el estrato subintimal. El tejido fijado en formol tamponado durante 48 h se sometió a un baño en alcohol 70° (15 min) y baño en solución de Herxheimer (15 min; Sudan IV 1%, alcohol 80° y acetona 1:1) con agitación constante. Finalmente se realizaron dos baños sucesivos en alcohol 80° (25 min) y se lavó con agua corriente (1 h). Luego, cada cayado se extendió sobre una lámina de telgopor con la superficie endotelial hacia arriba y se tomaron fotografías con una cámara digital Sony DSC-H300. Se empleó el software Image Pro Plus™ (Maryland, USA) para la cuantificación de la superficie intimal cubierta por la lesión sudanofílica expresándose los resultados en porcentaje.

4- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las respuestas se muestran como media \pm error estándar de la media (ES). Se usó el programa estadístico-graficador Prism GraphPad 3.0 (GraphPad Software, EE. UU.) para ajustar los valores obtenidos al realizar las CCR a la función sigmoidea y de esta manera calcular las constantes farmacológicas $R_{\text{máx}}$ y pEC_{50} . Los análisis comparativos entre y dentro de los grupos se realizaron con Anova de una vía y postest de Duncan. Se utilizó la prueba “t” de Student para estudios comparativos entre dos grupos (DC y DH). $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (prueba de dos colas).

III- RESULTADOS

1- Estandarización del extracto hidroalcohólico de *Zuccagnia punctata*: Análisis de marcadores químicos

Los resultados de la estandarización del ZpE se muestran en la **tabla 1**. Alrededor del 53 % de los CFT fueron CFF y el 47 % fueron CFNF. Los principales compuestos bioactivos fueron DHMC y DHC, cuya cantidad fue aproximadamente 10 veces mayor que HF y 12 veces mayor que DHF.

Teniendo en cuenta estudios previos referidos a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de DHMC y DHC (Moreno y col., 2015b; Nuño y col., 2016) así como evidencias recientes sobre el potencial terapéutico de las chalconas como agentes cardiovasculares (Mahapatra y Bharti, 2016) estos compuestos fueron seleccionados como marcadores activos y analíticos del extracto hidroalcohólico de *Z. punctata*.

Tabla 1. Estandarización del extracto hidroalcohólico de *Z. punctata*

Peso seco (mg/g mat.veg)	55±3
CFT (mg EAG/ml)	40±2
CFT (mg EAG/g ZpE seco)	1215±45
CFNF (mg EAG/g ZpE seco)	541±15
CFF (mg EAG/g ZpE seco)	644±12
DHMC (mg/g ZpE seco)	152,6±5,6
DHC (mg/g ZpE seco)	105,7±4,8
HF (mg/g ZpE seco)	13,1±0,7
DHF (mg/g ZpE seco)	8,2±0,3

Datos expresados como media ± ES. CFT: compuestos fenólicos totales; CFNF: compuestos fenólicos no flavonoides; CFF: compuestos fenólicos flavonoides; DHMC: 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona; DHC: 2',4'-dihidroxi-chalcona; HF: 7-hidroxiflavanona; DHF: 3,7-dihidroxi-flavona; EAG: equivalentes de ácido gálico; ZpE: extracto hidroalcohólico estandarizado de *Zuccagnia punctata*

2- Parámetros bioquímicos y clínicos

Finalizado el tratamiento, no se encontraron diferencias en el peso corporal entre ambos grupos. Los niveles plasmáticos de CT, HDL-C, LDL-C y TG fueron mayores en los conejos alimentados con DH respecto a los animales alimentados con DC (Tabla 2). Estos resultados nos permitieron aseverar que los ensayos *in vitro* de reactividad vascular fueron realizados con arterias de los conejos efectivamente hipercolesterolémicos.

Tabla 2. Valores de perfil lipídico y peso

	DC	DH
CT (mg/dl)	66,0±6,8	928±99 ^a
HDL-C (mg/dl)	57,8±3,6	130±28 ^a
LDL-C (mg/dl)	36,6±2,9	740±120 ^a
TG (mg/dl)	97,4±14,9	215±27 ^a
Peso (g)	2088±99	2188±64

Datos expresados como media ± ES; n=24. DC: conejos alimentados con dieta control; DH: conejos alimentados con dieta hipercolesterolémica; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; LDL-C: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos. ^a $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre DC y DH (test de 't' para muestras no pareadas).

3- Resultados de ensayos *in vitro*

3.1- Efecto vasodilatador

La CCR del ZpE (rango 4×10^{-2} a $40 \mu\text{g EAG/ml}$) y de los flavonoides DHC, HF o DHF (rango 10^{-9} a 10^{-4} M) en los anillos aórticos de conejos DC y DH precontraídos con Phe mostró a una relajación dependiente de la concentración. La R_{max} de HF fue más alta que la R_{max} de DHC en el grupo con DC. La R_{max} (%) de HF fue mayor que la de ZpE en arterias de animales de ambos grupos de dietas, sin embargo el patrón de relajación presentó algunas diferencias entre las arterias de conejos hipercolesterolémicos con respecto a arterias de conejos normocolesterolémicos: la sensibilidad al ZpE fue mayor en DH respecto a DC y la eficiencia de DHC fue mayor en DH respecto a DC (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de relajación máxima (R_{max}) y pEC_{50} del extracto estandarizado (ZpE) y los flavonoides de *Z. punctata* en conejos controles e hipercolesterolémicos

	DC		DH	
	R_{max}	pEC_{50}	R_{max}	pEC_{50}
ZpE (μg EAG/ml)	8,9 \pm 2,3 ^a	1,8 \pm 0,2	9,6 \pm 1,5 ^a	4,4 \pm 2,2 ^b
DHC (M)	6,2 \pm 1,2	4,4 \pm 0,6	17,6 \pm 2,1 ^b	4,9 \pm 0,2
HF (M)	20,6 \pm 6,7 ^c	5,8 \pm 0,7 ^c	27,1 \pm 8,1	5,3 \pm 0,6
DHF (M)	16,0 \pm 3,1	4,0 \pm 0,6	17,4 \pm 2,7	4,8 \pm 0,2

Datos expresados como media \pm ES; n=24. Efecto vasodilatador en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) o dieta hipercolesterolémica (DH) estimulados con curvas concentración respuesta al vehículo o al extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (ZpE) o sus flavonoides 2',4'-dihidroxichalcona (DHC), 7-hidroxi flavanona (HF) y 3,7-dihidroxiflavona (DHF), (n=24). ^a $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre la R_{max} (%) del ZpE y HF. ^b $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre DC y DH. ^c $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre la R_{max} (%) y pEC_{50} de DHC o DHF respecto a HF (Anova de una vía y postest de Duncan).

3.2- Efecto sobre la función endotelial

La incubación de los anillos aórticos de conejos DC y DH con el ZpE o con sus principales flavonoides no produce modificaciones en el tono basal (datos no mostrados) en ambos grupos de dieta ni en la respuesta a la Ach en arterias de conejos alimentados con DC. La R_{max} y pEC_{50} a la Ach fueron menores en arterias de conejos alimentados con DH (R_{max} 27 \pm 4 %, pEC_{50} 6,67 \pm 0,11) respecto a conejos alimentados con DC (R_{max} 55 \pm 9 %, pEC_{50} 7,04 \pm 0,09). La incubación de las arterias de conejos con DH arrojó los siguientes resultados:

- a- DHC 10^{-5} M mejoró la R_{max} sin llegar a igualar la respuesta del grupo DC (DH-DHC: 41 \pm 2 %; $p < 0,05$; Anova de una vía).
- b- Todas las concentraciones del ZpE y HF y las concentraciones más bajas de DHF y DHC mejoraron la sensibilidad a Ach respecto a las arterias tratadas con el vehículo (Tabla 4).
- c- ZpE 4×10^{-1} μg EAG/ml, DHC 10^{-7} y 10^{-9} M y DHF 10^{-9} M mejoran la sensibilidad a Ach respecto a arterias de conejos alimentados con DC.

Tabla 4. pEC_{50} a acetilcolina en arterias de conejos alimentados con dieta control o dieta hipercolesterolémica preincubadas con el extracto de *Z. punctata* y sus principales flavonoides a diferentes concentraciones

	DC	DH
Vehículo	7,04±0,09	6,67±0,11 ^a
ZpE 4x10 ⁻² µg EAG/ml	7,21±0,09	7,02±0,09 ^b
ZpE 4x10 ⁻¹ µg EAG/ml	7,22±0,06	7,48±0,13 ^{a, b, c}
ZpE 4 µg EAG/ml	7,13±0,18	7,09±0,04 ^b
DHC 10 ⁻⁹ M	7,07±0,09	7,31±0,13 ^{a, b, c}
DHC 10 ⁻⁷ M	7,37±0,10	7,81±0,07 ^{a, b, c}
DHC 10 ⁻⁵ M	6,91±0,13	6,87±0,05
HF 10 ⁻⁹ M	7,13±0,08	7,28±0,08 ^b
HF 10 ⁻⁷ M	7,27±0,07	7,14±0,12 ^b
HF 10 ⁻⁵ M	6,94±0,16	7,06±0,08 ^b
DHF 10 ⁻⁹ M	7,04±0,05	7,42±0,21 ^{a, b, c}
DHF 10 ⁻⁷ M	7,31±0,08	7,23±0,19 ^{b, c}
DHF 10 ⁻⁵ M	7,05±0,23	7,01±0,10

Datos expresados como media ± ES, n=24. . Efecto vasodilatador a la acetilcolina en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) o dieta hipercolesterolémica (DH) preincubados con el vehículo o con distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (ZpE) o sus flavonoides 2',4'-dihidroxichalcona (DHC), 7-hidroxiflavanona (HF) y 3,7-dihidroxiflavona (DHF) (n=24). ^a $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre DC y DH (Anova de una vía y postest de Duncan). ^b $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre arterias incubadas con el ZpE o sus flavonoides respecto a arterias tratadas con el vehículo. ^c $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a DC tratada con el vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan)

3.3- Efecto sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina

Las arterias de conejos alimentados con DC preincubadas con ZpE (4x10⁻² y 4x10⁻¹ µg EAG/ml), DHC, HF y DHF (10⁻⁹ y 10⁻⁷ M) disminuyen significativamente la respuesta contráctil a la Phe 5x10⁻⁶ M. En contraste, únicamente la concentración más baja de ZpE (4x10⁻² µg EAG/ml) y DHC (10⁻⁹ M) disminuyeron significativamente la respuesta

contráctil en arterias de conejos alimentados con DH (Fig. 19). Cuando se comparó la respuesta de arterias de conejos con DC y DH que recibieron el mismo tratamiento se observó que la concentración más alta de ZpE (4 μg EAG/ml) y de DHC (10^{-5} M) disminuyeron la respuesta a fenilefrina en arterias del grupo DH.

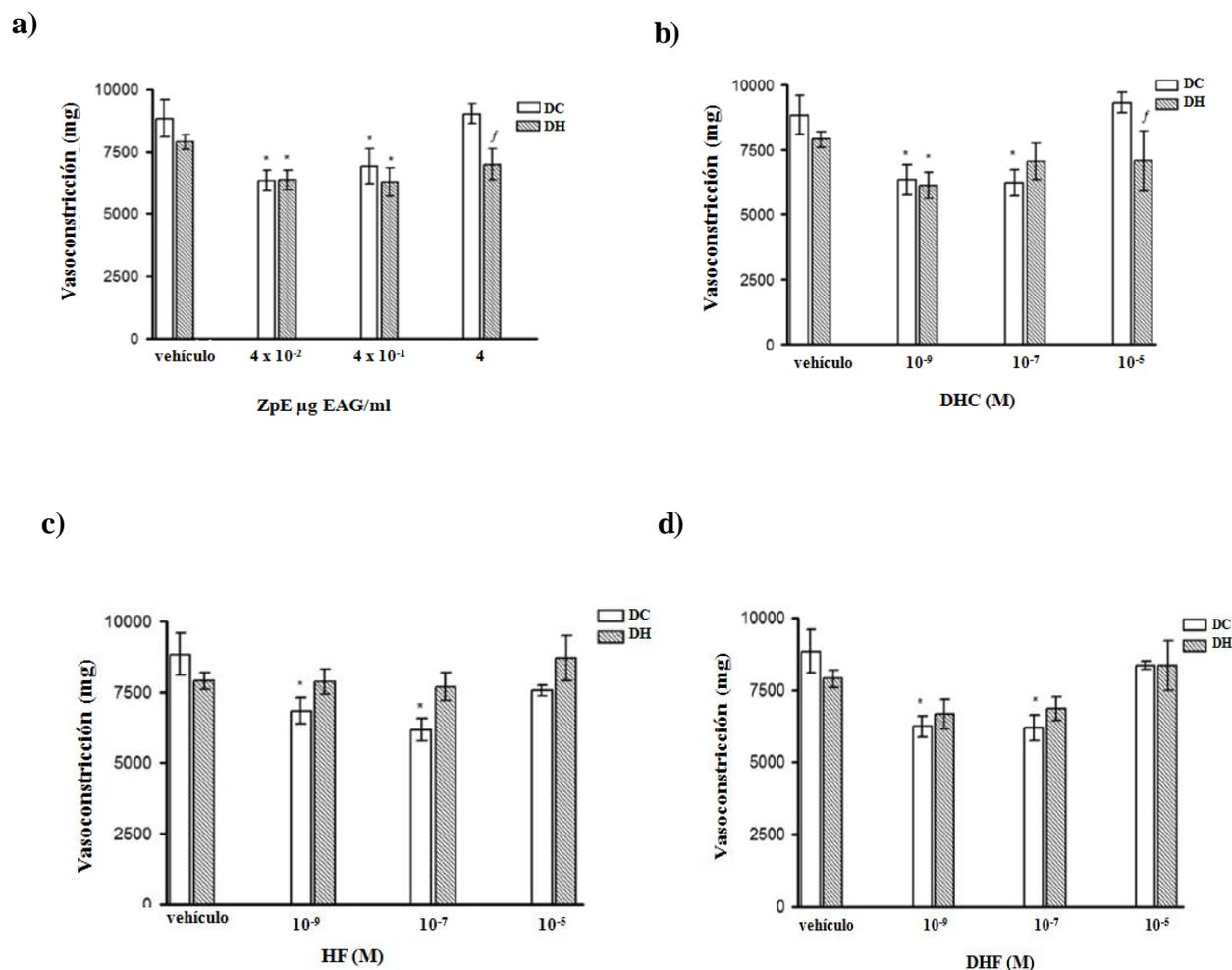


Fig. 19: Efecto sobre la respuesta a la fenilefrina (5×10^{-6} M) en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) o dieta hipercolesterolémica (DH) preincubados con el vehículo o con distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (ZpE) o sus flavonoides 2',4'-dihidroxichalcona (DHC), 7-hidroxi flavanona (HF) y 3,7-dihidroxi flavona (DHF), (n=24): a) ZpE (4×10^{-2} – 4×10^{-1} – 4 μg EAG/ml), b) DHC (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M), c) HF (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M), d) DHF (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M). * $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre arterias tratadas con el vehículo y las arterias incubadas con ZpE, DHC, HF o DHF en diferentes concentraciones (Anova de una vía y postest de Duncan). ^f $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre arterias de conejos DC y DH (test de “t” para muestras no pareadas)

3.4- Efecto sobre la respuesta contráctil a angiotensina II

La estimulación de los anillos aórticos con Ang II (10^{-10} a 10^{-6} M) produjo una respuesta contráctil dependiente de la concentración (Fig. 20). Las arterias conejos

alimentados con DC incubadas con ZpE, DHC y DHF en todas las concentraciones estudiadas, presentaron la misma $R_{m\acute{a}x}$ a Ang II que las arterias tratadas con el vehiculo (Fig. 20 a-d). Sin embargo, HF y DHF a la concentraci3n máxima (10^{-5} M) desensibilizaron la respuesta contráctil (desplazaron la CCR hacia la derecha, Fig. 20 c-d).

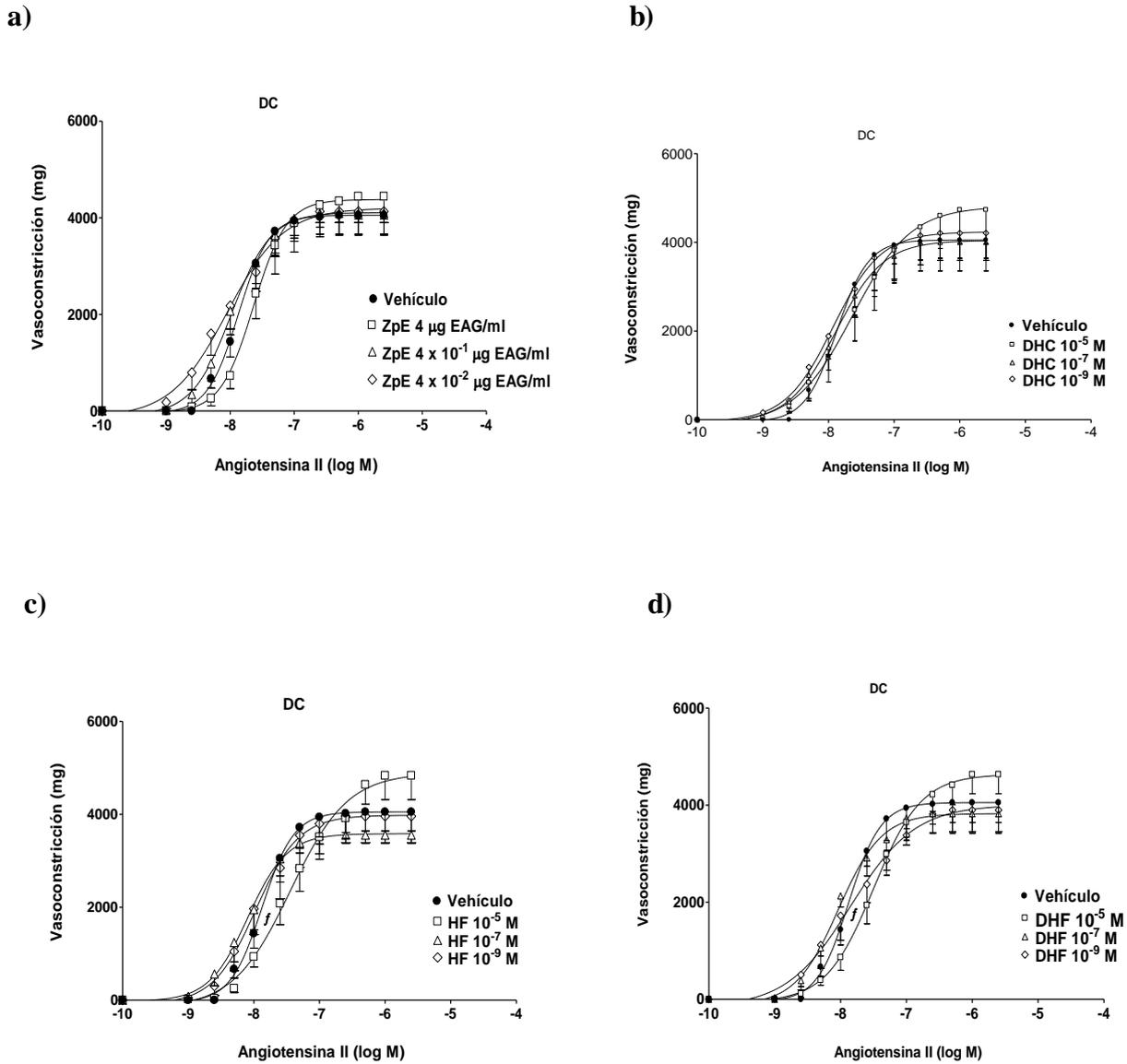


Fig. 20: Curvas concentraci3n respuesta a angiotensina II en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) preincubados con el vehiculo o con distintas concentraciones del extracto hidroalcoh3lico estandarizado de *Z. punctata* (ZpE) o sus flavonoides 2',4'-dihidroxichalcona (DHC), 7-hidroxi flavanona (HF) y 3,7-dihidroxi flavona (DHF), (n=24): a) ZpE (4×10^{-2} – 4×10^{-1} – 4 μ g EAG/ml), b) DHC (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M), c) HF (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M), d) DHF (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M). ^f $p < 0,05$ indica diferencia estadisticamente significativa en el pEC_{50} de arterias incubadas con HF 10^{-5} M y DHF 10^{-5} M respecto al grupo tratado con el vehiculo (Anova de una vía y postest de Duncan).

El tratamiento de los anillos aórticos de conejos alimentados con DH produjo diferentes efectos de acuerdo al compuesto y las concentraciones estudiadas (Fig. 21 a-d):

- la concentración más altas del ZpE ($4 \mu\text{g EAG/ml}$), DHC y DHF (10^{-5} M) disminuyeron la $R_{\text{máx}}$ a Ang II (Fig. 21 a-b-d)
- las concentraciones más bajas del ZpE (4×10^{-2} y $4 \times 10^{-1} \mu\text{g EAG/ml}$) y todas las concentraciones de DHC y DHF desensibilizaron la respuesta contráctil a Ang II (desplazaron la CCR de la Ang II hacia la derecha) (Fig. 21 a-b-d).

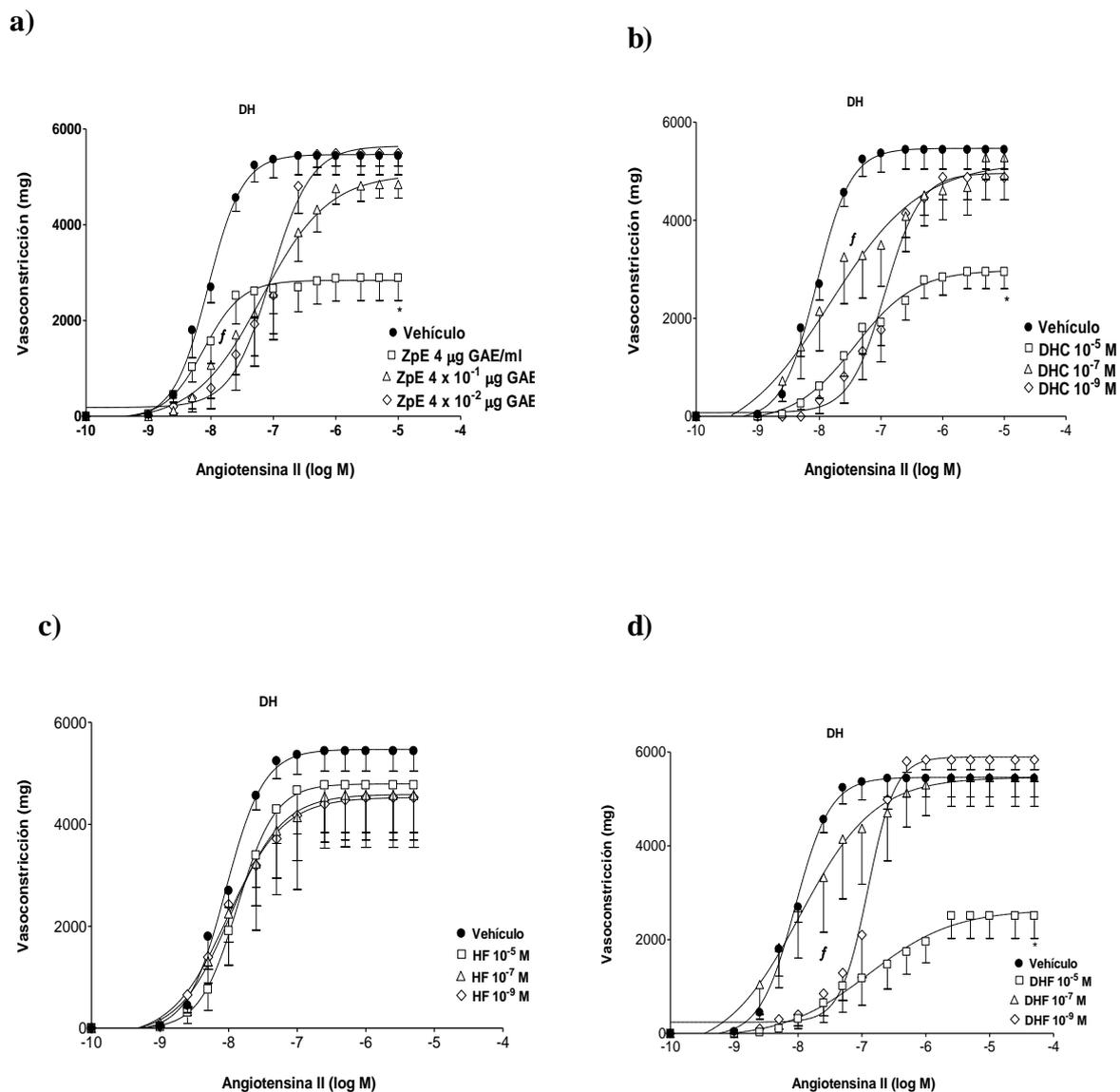


Fig. 21: Curvas concentración respuesta a angiotensina II en arterias de conejos alimentados con dieta hipercolesterolemica (DH) preincubados con el vehículo o con distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (ZpE) o sus flavonoides 2',4'-dihidroxichalcona (DHC), 7-hidroxi flavanona (HF) y 3,7-dihidroxi flavona (DHF), (n=24): a) ZpE (4×10^{-2} – 4×10^{-1} – $4 \mu\text{g EAG/ml}$), b) DHC (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M), c) HF (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M), d) DHF (10^{-9} – 10^{-7} – 10^{-5} M). * $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en la $R_{\text{máx}}$ entre el grupo incubado con el vehículo y los grupos incubados con ZpE $4 \mu\text{g EAG/ml}$, DHC y DHF 10^{-5} M (Anova de una vía y postest de Duncan); f $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre $p\text{EC}_{50}$ de los tratamientos con ZpE (4×10^{-2} y $4 \times 10^{-1} \mu\text{g EAG/ml}$) y DHC y DHF en todas las concentraciones incubadas (10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} M) respecto al vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan).

4- Resultados de ensayos *in vivo*

4.1- PARTE I: Efecto de la administración oral del extracto de *Zuccagnia punctata* en conejos controles – Ensayos de Toxicidad y Estudio de Rango de Dosis

4.1.1- Ensayo de toxicidad aguda: Administración oral de 2,5 mg EAG/ml del extracto de *Zuccagnia punctata*

Luego de la administración oral de 250 mg EAG/ml (100 veces mayor que la dosis terapéutica del ZpE observada en el estudio de rango de dosis, ver pag. 55) no se observaron signos de toxicidad aguda como sedación, picazón, salivación, diarrea, cianosis o mortalidad en ninguno de los animales tratados. Se evaluó la actividad de enzimas hepáticas GOT y GPT, bilirrubina y creatinina en sangre. No se encontraron cambios significativos respecto al grupo control tratado con el vehículo, de modo que es posible afirmar la ausencia de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad (Tabla 5). También se evaluó el peso y aspecto del hígado, riñón y corazón sin encontrar diferencias respecto al grupo tratado con el vehículo.

Tabla 5. Ensayo de toxicidad aguda a 250 mg EAG/ml del extracto de *Zuccagnia punctata*

	DC	DC-ZpE ₂₅₀
GOT (U/l)	21,3±3,9	18,2±2,3
GPT (U/l)	20,5±4,1	16,9±2,1
Creatinina (mg/dl)	0,81±0,04	1,03±0,10
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,32±0,03	0,28±0,02
Bilirrubina Directa (mg/dl)	0,09±0,02	0,07±0,02
Bilirrubina Indirecta (mg/dl)	0,2±0,03	0,25±0,01
Hígado (% peso corporal)	3,19±0,14	2,89±0,21
Riñón (% peso corporal)	0,34±0,05	0,33±0,02
Corazón (% peso corporal)	0,27±0,02	0,25±0,03

Datos expresados como media ± ES, n=6 conejos por grupo. DC: conejos alimentados con dieta control (DC) y tratados con el vehículo o con 250 mg EAG/ml del extracto de *Zuccagnia punctata*

4.1.2- Ensayo de toxicidad crónica y estudio de rango de dosis: Administración oral de 2,5 - 5 – 10 mg EAG/ml del extracto de *Zuccagnia punctata*

4.1.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos

La administración oral del ZpE (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día) durante 6 semanas no produjo modificaciones en la PAM, glucosa basal, creatinina o parámetros hematológicos (Tabla 6). El CT disminuyó significativamente con la administración de 2,5 mg EAG/día. Los tratamientos con 5 y 10 mg EAG/día redujeron la GOT y bilirrubina directa con respecto al grupo tratado con el vehículo. El aumento de peso corporal durante el período de tratamiento fue similar en los distintos grupos y tampoco se encontraron diferencias significativas en el peso corporal al finalizar el estudio.

No se observaron diferencias significativas en el tamaño de hígado y corazón (relación hígado/peso corporal, o corazón/peso corporal) entre los grupos tratados con distintas dosis de ZpE y el grupo tratado con el vehículo. Sin embargo, la relación riñón/peso corporal está incrementada en los conejos que recibieron el ZpE a dosis 10 mg EAG/día (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos de conejos alimentados con DC administrados con 2,5 - 5- 10 mg EAG / día del extracto de *Zuccagnia punctata*.

	DC	DC-ZpE _{2,5}	DC-ZpE ₅	DC-ZpE ₁₀
Peso (g)	2088±99	1920±144	2200±100	1957±99
PAM (mmHg)	60,5±3,5	58,3±2,5	79±3,4	64,5±0,5
Glucosa basal (mg/dl)	113,2±2,7	119,2±4,1	116,8±6,7	125,8±5,5
Colesterol total (mg/dl)	66±6,8	35,1±6,1 ^a	40,2±11,3	58,4±14,7
Triglicéridos (mg/dl)	97,4±14,9	81,0±20,6	90,1±12	131,3±15,4
Creatinina (mg/dl)	0,81±0,04	0,82±0,2	0,81±0,25	0,81±0,25
GOT (U/l)	21,3±3,9	15,6±0,6	4,2±1,9 ^a	3,0±1,9 ^a
GPT (U/l)	20,5±4	18,6±0,5	20,4±1,5	19±1,9
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,32±0,03	0,24±0,01	0,32±0,04	0,39±0,11
Bilirrubina Directa (mg/dl)	0,09±0,02	0,07±0,01	0,03±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a
Bilirrubina Indirecta (mg/dl)	0,2±0,03	0,17±0,02	0,28±0,04	0,30±0,08
Hígado (% peso corporal)	3,19±0,14	2,87±0,26	3,12±0,16	3,5±0,09
Riñón (% peso corporal)	0,34±0,05	0,30±0,01	0,32±0,02	0,55±0,16 ^a
Corazón (% peso corporal)	0,27±0,02	0,22±0,02	0,24±0,01	0,26±0,02
Hto (%)	41,1±1,2	39±1,6	41,9±1,7	45±1,2
Leucocitos (x 10 ³ mm ³)	13,2±2,1	10,6±1,3	11,6±2,5	13,0±1,5

Datos expresados como media ± ES, n=6 conejos por grupo. DC: conejos alimentados con dieta control tratados con el vehículo o tratados con ZpE (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día). ^a $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con ZpE a diferentes dosis y el vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan).

4.1.2.2- Efecto sobre la función endotelial

El extracto no modificó la R_{max} a la Ach en ninguna de las dosis administradas oralmente (DC: 51 ± 4 %; DC-ZpE_{2,5}: 60 ± 3 %; DC-ZpE₅: 44 ± 4 %; DC-ZpE₁₀: 52 ± 3 %). La dosis más baja produjo una sensibilización de la respuesta vasodilatadora (desplazamiento hacia la izquierda de la CCR; pEC₅₀ DC: $7,04 \pm 0,09$; DC-ZpE_{2,5}: $7,26 \pm 0,03$; DC-ZpE₅: $7,09 \pm 0,06$; DC-ZpE₁₀: $6,88 \pm 0,08$) lo que indica que cuando se administra oralmente ZpE en dosis de 2,5 mg EAG/día se requiere una menor concentración de Ach para obtener el mismo efecto que cuando se administra el vehículo (Fig. 22).

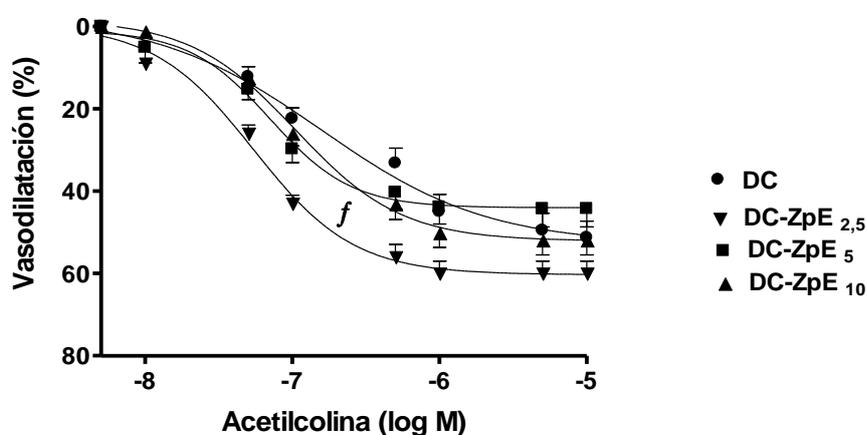


Fig. 22: Curvas concentración respuesta a acetilcolina en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) tratados con el vehículo o con el extracto hidroalcohólico estandarizado (ZpE) de *Z. punctata* (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día. ^f $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en el pEC₅₀ entre el grupo tratado con 2,5 mg EAG/día del ZpE respecto al grupo tratado con el vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan, n=12).

4.1.2.3- Efecto sobre la reactividad del músculo liso

La administración oral del extracto no modificó la R_{max} a Ang II en aortas de conejos controles (DC: 4121 ± 560 mg; DC-ZpE_{2,5}: 4305 ± 358 mg; DC-ZpE₅: 4099 ± 278 mg; DC-ZpE₁₀: 3846 ± 294 mg) (Fig. 23a). Sin embargo, la dosis de 2,5 mg EAG/día desensibilizó significativamente las arterias a la respuesta contráctil a Ang II (provocó un desplazamiento de la CCR hacia la derecha (pEC₅₀ DC: $7,89 \pm 0,17$; DC-ZpE_{2,5}: $7,55 \pm 0,14$; DC-ZpE₅: $7,69 \pm 0,12$; DC-ZpE₁₀: $7,78 \pm 0,13$).

Con respecto al efecto de la administración oral del extracto sobre la respuesta contráctil a la NA, se observó que la dosis de 2,5 mg EAG/día desensibilizó la respuesta (provocó un desplazamiento de la curva hacia la derecha (pEC_{50} DC: $6,26 \pm 0,01$; DC-ZpE_{2,5}: $5,89 \pm 0,09$; DC-ZpE₅: $6,13 \pm 0,09$; DC-ZpE₁₀: $6,68 \pm 0,14$) (Fig. 23b) y disminuyó la $R_{m\acute{a}x}$.

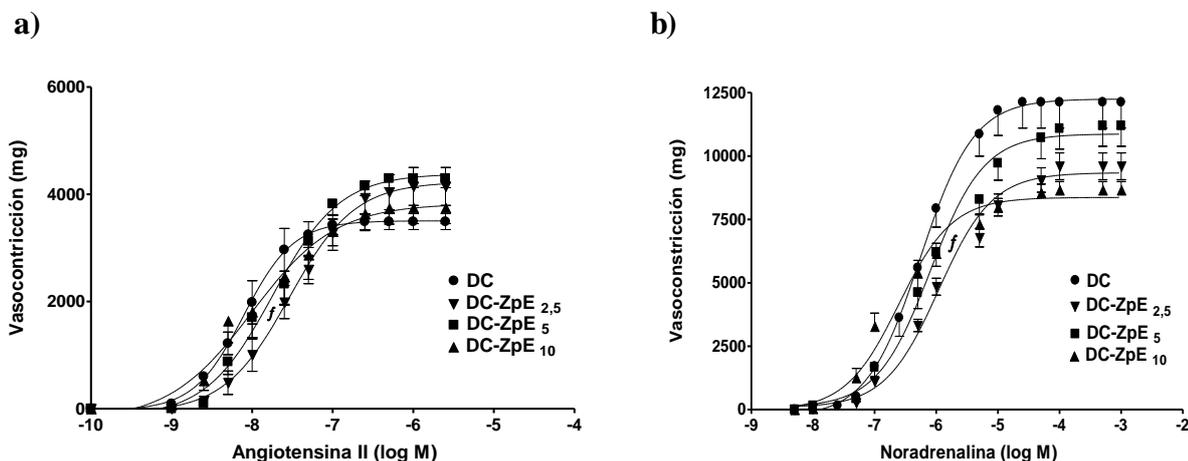


Fig. 23: a) Curvas concentración respuesta a angiotensina II en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) tratados con el vehículo o con el extracto hidroalcohólico estandarizado (ZpE) de *Z. punctata* (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día). b) Curvas concentración respuesta a noradrenalina en arterias de conejos alimentados con DC tratados con el vehículo o con ZpE (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día). * $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en la $R_{m\acute{a}x}$ entre el grupo tratado con ZpE 2,5 mg EAG/día respecto al grupo tratado con el vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan, $n=12$). ^f $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en el pEC_{50} entre el grupo tratado con ZpE 2,5 mg EAG/día respecto al grupo tratado con el vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan, $n=12$).

4.2- PARTE II: Efecto de la administración oral de 2,5 mg EAG/día del extracto de *Zuccagnia punctata* en conejos alimentados con dieta enriquecida en colesterol al 1%

4.2.1- Efecto sobre los parámetros bioquímicos, clínicos y hematológicos

La DH incrementa significativamente los niveles de CT, TG, bilirrubina (total, directa e indirecta) y los niveles de GOT. También hay un aumento en la relación hígado/peso corporal y riñón/peso corporal y en el número de leucocitos; el Hto está reducido (Tabla 7). La administración oral del extracto de *Z. punctata* a dosis de 2,5 mg EAG/día disminuyó los niveles de CT, normalizó la concentración plasmática de TG, bilirrubina (total, directa e indirecta), como así también los niveles de GOT, Hto y leucocitos. También se observa una reducción en la PAM. No provoca cambios en la relación hígado/peso corporal respecto conejos con DH tratados con el vehículo. Los conejos con DH tratados con rosuvastatina no modificaron los valores de CT, pero

normalizaron los niveles de TG, bilirrubina directa y GOT; también mejoró los valores de Hto, leucocitos y PAM.

Tabla 7. Parámetros bioquímicos, clínicos, y hematológicos de conejos controles e hipercolesterolémicos administrados con ZpE (2,5 mg EAG/día) y Rosuvastatina (2,5 mg/día).

	CD	CD-ZpE _{2,5}	DH	DH-ZpE _{2,5}	DH-Ro _{2,5}
Peso (g)	2088±99	2037±121	2188±64	2086±41	1860±42
PAM (mmHg)	60,5±3,5	55,3±3,7	73,2±2,4	50±2 ^b	50,2±4,6 ^b
Frecuencia cardiaca	277,6±29	252±10	226±11	225±5	230±8
Glucemia basal (mg/dl)	113,2±2,7	120,7±2,9	115,3±3,5	129±2	130±11
Colesterol total (mg/dl)	78,4±6,4	34,6±3,7 ^b	928±99 ^a	369±84 ^b	816±225
HDL-C (mg/dl)	54,7±2,8	12,2±2 ^b	115,5±36 ^a	16,5±0,8 ^b	16,5±1,5 ^b
LDL-C (mg/dl)	35,1±2,3	8,4±1,1 ^b	692±112 ^a	308±76 ^{a,b}	784±195
Triglicéridos (mg/dl)	97,4±14,9	85,3±14,8	215±27 ^a	93,7±15 ^b	79±13 ^b
Creatinina (mg/dl)	0,81±0,04	0,74±0,14	0,97±0,13	0,70±0,2	0,94±0,09
GOT (U/l)	21,1±1,5	23,3±1,4	32,3±3,3 ^a	20,9±3,2 ^b	16,7±3,8 ^b
GPT (U/l)	19,6±3,9	24,6±1,8	9,3±1,9 ^a	8,44±1,2	7,4±1,4
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,32±0,03	0,24±0,01	0,65±0,17 ^a	0,24±0,03 ^b	0,43±0,1
Bilirrubina Directa (mg/dl)	0,086±0,02	0,07±0,01	0,1±0,05 ^a	0,06±0,02 ^b	0,03±0,01 ^b
Bilirrubina Indirecta (mg/dl)	0,2±0,03	0,17±0,02	0,55±0,15 ^a	0,18±0,01 ^b	0,41±0,10
Hígado (% peso corporal)	3,19±0,14	2,96±0,15	4,1±0,2 ^a	4,27±0,2	4,9±0,1
Riñón (% peso corporal)	0,34±0,05	0,29±0,14	0,44±0,1 ^a	0,30±0,01 ^b	0,43±0,03
Corazón (% peso corporal)	0,27±0,02	0,24±0,1	0,23±0,03	0,23±0,01	0,25±0,10
Hto (%)	41,0±1,2	39,0±1,6	34,3±1,0 ^a	41,0±2,9 ^b	41,8±1 ^b
Leucocitos (x 10 ³ mm ³)	12,2±2,1	10,6±1,3	16,7±1,5 ^a	12,3±0,8 ^b	12,6±2,4 ^b

Datos expresados como media ± ES, n= 6 conejos por grupo. Conejos alimentados con dieta control (DC) y dieta hipercolesterolémica (DH) tratados con el vehículo o tratados con el ZpE (2,5 mg EAG/día) y rosuvastatina (Ro; 2,5 mg/día). PAM: presión arterial media; Hto: hematocrito. ^a $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre DC y DH. ^b $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con ZpE o Ro y los grupos tratados con el vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan).

4.2.2- Efecto sobre la función endotelial

La Ach provocó una vasodilatación dependiente de la concentración en todos los grupos estudiados. Las arterias de conejos alimentados con DH mostraron respuestas a la Ach significativamente disminuidas. La administración de ZpE no modificó la vasodilatación a la Ach en el grupo DC, pero en conejos con tratamiento de DH normalizó la R_{max} de la Ach cuando es administrado junto con la dieta (R_{max} ; DC: 66,2±5,2 %; DH: 27,3±3,8 %; DC-ZpE_{2,5}: 60,5±6,2 %; DH-ZpE_{2,5}: 65,9±8 %; DH-Ro_{2,5}: 42,5±4,2%; $p < 0,05$; Anova de una vía y postest Duncan). Además, el tratamiento con ZpE mejoró la sensibilidad a la Ach en conejos con DC como así también en conejos con DH (pEC_{50} ; DC: 7,01±0,07; DH: 6,67±0,11; DC-ZpE_{2,5}: 7,18±0,05; DH-ZpE_{2,5}: 7,23±0,08; DH-Ro_{2,5}: 7,06±0,11; $p < 0,05$; Anova de una vía y postest de Duncan). El tratamiento con rosuvastatina no modificó la R_{max} ni pEC_{50} a la Ach en conejos con dieta DH.

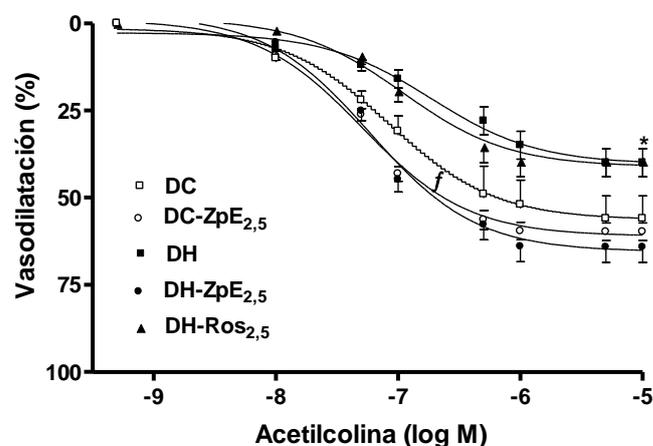


Fig. 24: Curvas concentración respuesta a acetilcolina en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) tratados con el vehículo, conejos alimentados con dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo, conejos alimentados con DC tratados con 2,5 mg EA G/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DC-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg EA G/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DH-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg/día de rosuvastatina (DH-Ro_{2,5}). Los efectos vasodilatadores se expresaron como porcentaje de disminución de la contracción máxima a la Phe. . * $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en la relajación máxima entre DH y DH-ZpE_{2,5} (Anova de una vía y postest de Duncan, $n=12$), ^f $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en pEC₅₀ de DH-ZpE_{2,5} y DC-ZpE_{2,5} respecto a los grupos tratados con el vehículo (Anova de una vía y postest de Duncan, $n=12$).

4.2.3- Efecto sobre la reactividad del músculo liso

Los conejos con DH tuvieron un aumento de la R_{max} y la sensibilidad a Ang II con respecto a conejos con DC (Fig. 25). El efecto de la administración de ZpE sobre la respuesta contráctil a Ang II fue dependiente de la dieta: disminuyó la R_{max} en conejos alimentados con DH (DC: 4052 ± 30 ; DC-ZpE_{2,5}: 4223 ± 42 ; DH: 5485 ± 91 ; DH-ZpE_{2,5}: 3909 ± 59 ; DH-Ro_{2,5}: 4200 ± 64) y la afinidad en conejos alimentados con DC (pEC₅₀ DC: $7,87 \pm 0,01$; DC-ZpE_{2,5}: $7,54 \pm 0,02$; DH: $8,70 \pm 0,05$; DH-ZpE_{2,5}: $8,24 \pm 0,03$; DH-Ro_{2,5}: $8,30 \pm 0,21$). El tratamiento con rosuvastatina también redujo significativamente la respuesta contráctil a la Ang II en conejos DH.

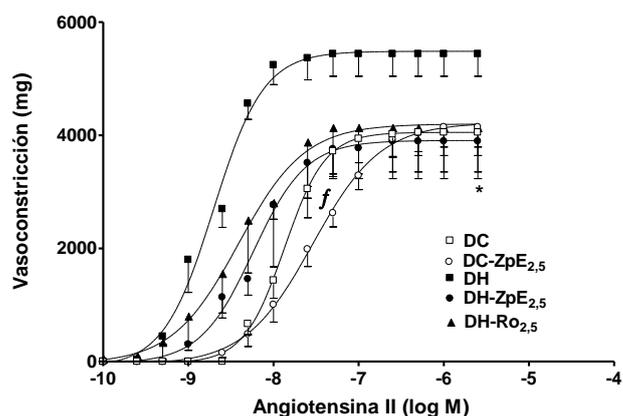


Fig. 25: Curvas concentración respuesta a angiotensina II en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) tratados con el vehículo, conejos alimentados con dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo, conejos alimentados con DC tratados con 2,5 mg EA G/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DC-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg EA G/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DH-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg/día de rosuvastatina (DH-Ro_{2,5}). * $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en la respuesta máxima entre DH y los grupos DH-ZpE_{2,5} y DH-Ro_{2,5} (Anova de una vía y postest de Duncan, n=12). ^f $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en pEC₅₀ entre DC y DC-ZpE_{2,5} (Anova de una vía y postest de Duncan, n=12).

Por otra parte, la R_{max} y el pEC₅₀ a NA fueron similares en conejos alimentados con DC y conejos alimentados con DH (Fig. 26). La administración oral de ZpE redujo la afinidad a la NA en ambos grupos de dieta (pEC₅₀ DC: 6,23±0,03; DC-ZpE_{2,5}: 5,98±0,08; DH: 6,50±0,04; DH-ZpE_{2,5}: 5,94±0,06 ; DH-Ro_{2,5}: 7,35±0,10) y la R_{max} solo en conejos alimentados con DC tal como fue descrito en la sección 4.1.2.3 (DC: 12320±114; DC-ZpE_{2,5}: 9163±253; DH: 10960±134; DH-ZpE_{2,5}: 9873±234; DH-Ro_{2,5}: 10160±252). La rosuvastatina aumentó la afinidad por la NA.

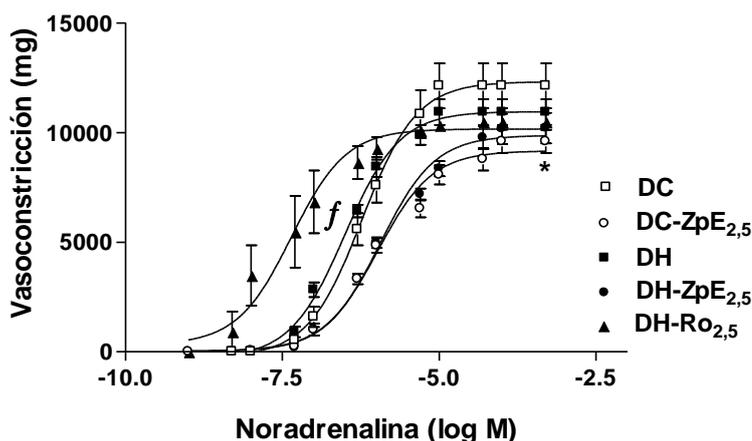


Fig. 26: Curvas concentración respuesta a noradrenalina en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) tratados con el vehículo, conejos alimentados con dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo, conejos alimentados con DC tratados con 2,5 mg EA G/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DC-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg EA G/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DH-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg/día de rosuvastatina (DH-Ro_{2,5}). * $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en la respuesta entre DC y DC-ZpE_{2,5} (Anova de una vía y postest de Duncan, n=12); ^f $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa en pEC₅₀ de DC o DH tratados con el vehículo respecto a los grupos que recibieron el tratamiento con ZpE o Ro (rosuvastatina) (Anova de una vía y postest de Duncan, n=12).

La respuesta al nitroprusiato de sodio (NP) 10^{-6} M (vasodilatador independiente de endotelio) fue similar en todos los grupos (Fig. 27).

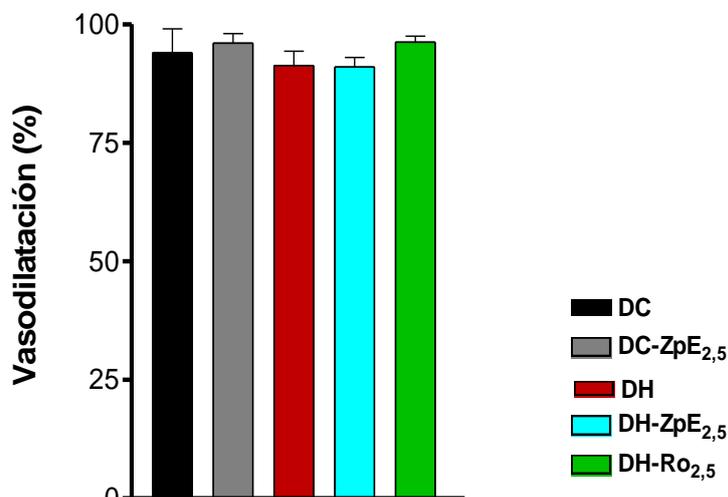


Fig. 27: Estimulación única con nitroprusiato de sodio (NP) 10^{-6} M en arterias de conejos alimentados con dieta control (DC) tratados con el vehículo, conejos alimentados con dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo, conejos alimentados con DC tratados con 2,5 mg EAG/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DC-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg EAG/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DH-ZpE_{2,5}), conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg/día de rosuvastatina (DH-Ro_{2,5}). No se observaron diferencias significativas entre los grupos, n=12.

4.2.4- Efecto sobre parámetros de estrés oxidativo

La administración oral de ZpE (2,5 mg EAG/día) redujo significativamente la peroxidación lipídica sérica en conejos alimentados con DH respecto al grupo tratado con el vehículo (Fig. 28 a).

La relación GSH/GSSG fue mayor en conejos alimentados con DH y tratados con ZpE con respecto al grupo tratado solo con el vehículo (Fig. 28 b).

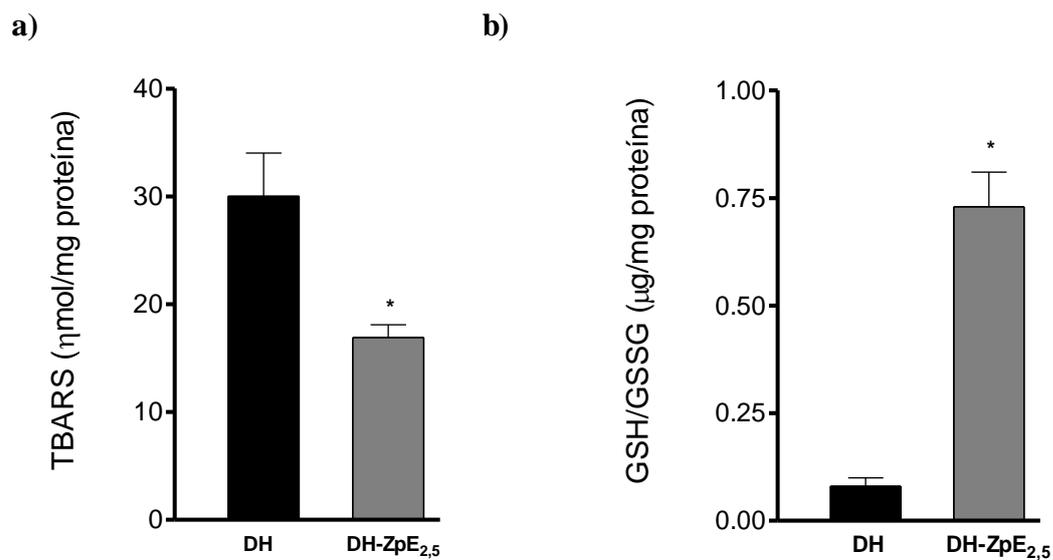


Fig. 28: Efecto del tratamiento oral con el extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (ZpE) 2,5 mg EA G/día sobre parámetros oxidativos en suero de conejos hipercolesterolémicos. Conejos alimentados con dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo; conejos alimentados con DH tratados con 2,5 mg/día del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Z. punctata* (DH-ZpE_{2.5}). a) Peroxidación lipídica (TBARS), b) Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH / GSSG). * $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre DH y DH-ZpE_{2.5} (test de 't' para muestras no pareadas, n=12).

4.2.5- Efecto sobre la morfohistología vascular

4.2.5.1- Histometría: El examen histológico mostró un engrosamiento moderado de la túnica íntima en arterias de conejos alimentados con DH respecto a DC. La administración de ZpE (2,5 mg EAG/día) o rosuvastatina (2,5 mg/día) normalizó la relación íntima/media (Tabla 8). Se muestran fotografías representativas de los cambios morfológicos en la arteria aorta de los cinco grupos en tratamiento, teñidas con el método de hematoxilina-eosina (H&E) (Fig. 29 a-e).

Tabla 8. *Histometría de la pared vascular de conejos controles e hipercolesterolémicos tratados con ZpE (2,5 mg EAG/día) y Rosuvastatina (2,5 mg/día).*

	E (%)	MLV (%)	ÍNTIMAMEDIA
DC	4,9 ± 0,3	129,3 ± 2,8	0,038 ± 0,002
DC-ZpE _{2,5}	7,7 ± 0,3	165,7 ± 2,7	0,046 ± 0,002
DH	123,4 ± 8,2 ^a	173,3 ± 8,1 ^a	0,716 ± 0,036 ^a
DH-ZpE _{2,5}	6,1 ± 0,8 ^b	151,3 ± 10,3	0,039 ± 0,003 ^b
DH-Ro _{2,5}	4,4 ± 0,2 ^b	109,4 ± 3,6 ^b	0,040 ± 0,002 ^b

Datos expresados como media ± ES, n = 6. Conejos alimentados con dieta control (DC) y dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo o tratados con el extracto hidroalcohólico estandarizado de *Zuccagnia punctata* (ZpE; 2,5 mg EAG/día) o con rosuvastatina (Ro; 2,5 mg/día); endotelio (E); músculo liso vascular (MLV). ^a $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre los conejos alimentados con DC y DH (Anova de una vía y postest de Duncan). ^b $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa entre conejos alimentados con DH tratados con el vehículo o tratados con ZpE o con rosuvastatina (DH-ZpE_{2,5} y DH-Ro_{2,5}, respectivamente), Anova de una vía y postest de Duncan.

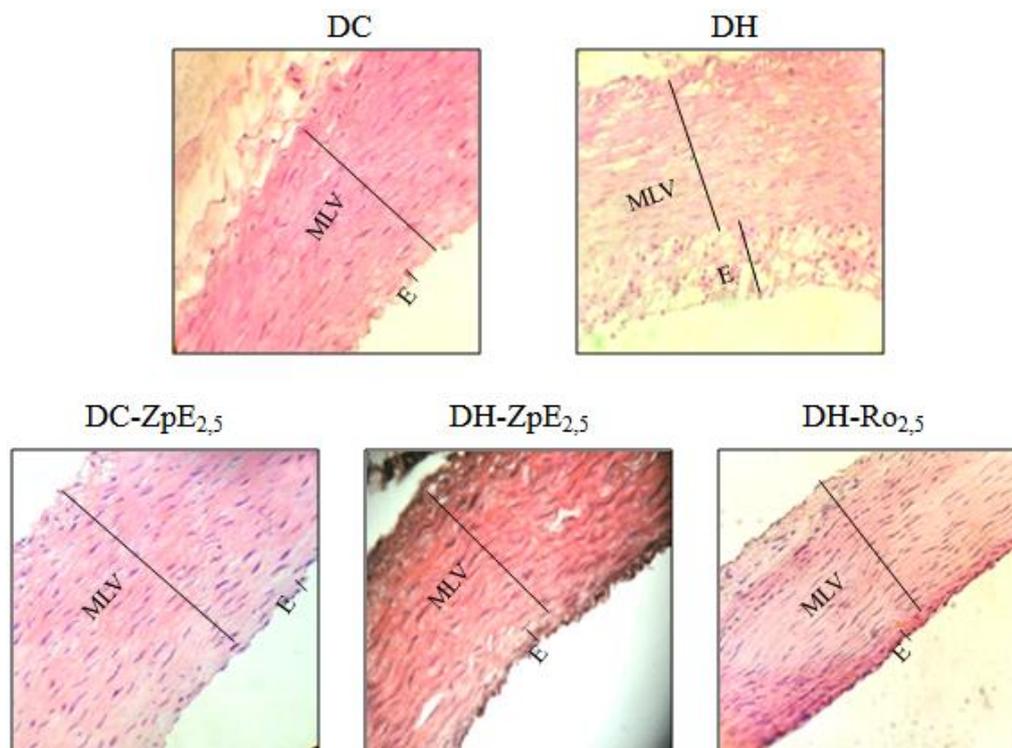


Fig. 29: Imágenes fotográficas (40x) de la pared arterial de conejos alimentados con dieta control (DC) y dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo o tratados con el extracto hidroalcohólico de *Zuccagnia punctata* (ZpE; 2,5 mg EA G/día) o rosuvastatina (Ro; 2,5 mg/día); endotelio (E); músculo liso vascular (MLV). Técnica H&E.

4.2.5.2- Porcentaje de área sudanofílica: La administración oral de 2,5 mg EAG/día de ZpE o rosuvastatina a conejos alimentados con DH redujo de forma significativa el porcentaje de área sudanofílica (% DC: $0,09 \pm 0,01$; DC-ZpE: $0,07 \pm 0,01$; DH: $86,40 \pm 4,10$; DH-ZpE: $7,50 \pm 0,20$; DH-Ro: $0,30 \pm 0,10$; $p < 0,05$, Anova de una vía y postest de Duncan, $n=6$), lo que indica que el depósito lipídico es menor en conejos tratados con el ZpE y Ro.

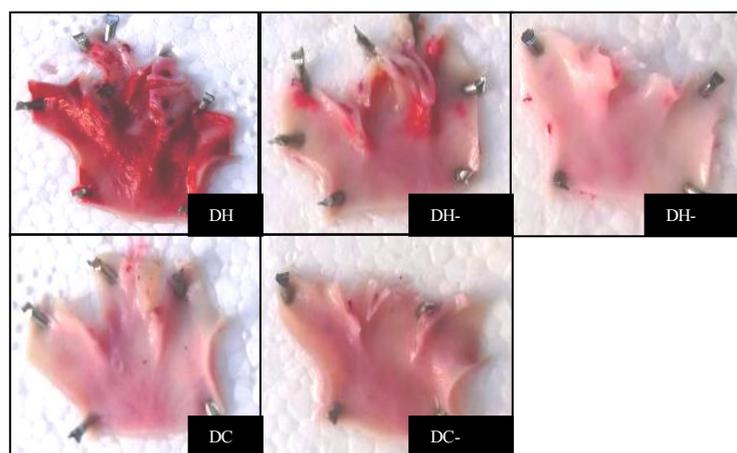


Fig. 30: Imágenes de cayados aórticos de conejos alimentados con dieta control (DC) y dieta rica en colesterol (DH) tratados con el vehículo o tratados con el extracto hidroalcohólico de *Zuccagnia punctata* (ZpE; 2,5 mg EAG/día) o rosuvastatina (Ro; 2,5 mg/día).

IV- DISCUSIÓN

Z. punctata Cav. (Fabaceae), es una especie endémica argentina ampliamente distribuida en las zonas áridas y semiáridas del oeste de Argentina, desde Jujuy hasta Chubut (Cabrera, 1971). Es una planta muy rica en flavonoides (Svetaz y col., 2004; Moreno y col., 2015a), compuestos cuyos efectos benéficos sobre los factores de riesgo de ECV han sido ampliamente documentados en los últimos años. Como fue mencionado previamente, hay evidencia que demuestra que los extractos de *Z. punctata* presentan una potente actividad depuradora de radicales libres y capacidad antiinflamatoria mediada por la inhibición de la COX-2 y la LOX (Moreno y col., 2015b; Nuño y col., 2016). Los responsables de esta actividad serían los flavonoides relacionados biosintética y estructuralmente: DHC, DHMC, HF y DHF (Morán Vieyra y col., 2009; Moreno y col., 2015b; Isla y col., 2016).

En trabajos previos se desarrolló un modelo de conejo hipercolesterolemico por alimentación con una dieta rica en colesterol al 1% (DH) caracterizado por disfunción vascular, estrés oxidativo, inflamación y alteraciones hematológicas (Jerez y col., 2008; Karbiner y col., 2013; Medina y col., 2015). En este trabajo de tesis doctoral se estudió el efecto de un extracto hidroalcohólico estandarizado de *Zuccagnia punctata* (ZpE) en dicho modelo. Se realizaron estudios *in vitro* para estudiar la respuesta vascular del ZpE y sus flavonoides (DHC, HF y DHF) y estudios *in vivo* para investigar los efectos vasculares, clínicos y bioquímicos.

En los estudios *in vitro* se caracterizó el efecto del ZpE y los flavonoides presentes en el mismo sobre la reactividad vascular en aorta aislada de conejos alimentados con dieta control (DC) y DH. Teniendo en cuenta las propiedades vasodilatadoras ampliamente demostradas de los flavonoides (Ji y col., 2017; Sun y col., 2013; Silva y col., 2013; Torres-Piedra y col., 2011), se evaluó el efecto vasodilatador del ZpE, DHC, HF y DHF en arterias con un tono equivalente al 50 % del máximo de respuesta contráctil al agonista adrenérgico α_1 fenilefrina (Phe). Los resultados mostraron que el ZpE indujo una vasodilatación débil pero significativa, y tuvo una eficacia (% $R_{m\acute{a}x}$) similar en ambos grupos de dieta, pero fue más sensible (pEC_{50}) en arterias de conejos con DH. El flavonoide HF fue el compuesto más eficiente para inducir vasodilatación tanto en conejos DC como en DH. DHF indujo una vasodilatación similar en ambos grupos de dieta y DHC fue más eficiente en arterias de conejos con DH. La relajación del MLV ocurre como resultado de la eliminación del estímulo contráctil o por la acción directa de una sustancia que inhibe el mecanismo contráctil (Wani y col., 2017), a través de la disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} . La modulación por las ERO de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ha sido ampliamente estudiada (Kiselov y Muallen, 2016). Se ha demostrado que las ERO activan los receptores de IP3 presentes en el retículo sarcoplásmico induciendo la salida de Ca^{2+} hacia el sarcoplasma e incrementando así la reactividad vascular (Bansaghi y col., 2014).

Considerando que estudios previos han demostrado que ZpE y sus flavonoides tienen demostrada actividad antioxidante (Moran Vieyra y col., 2009; Isla y col., 2016), se puede hipotetizar que los flavonoides presentes en ZpE pueden ser los responsables de su propiedad vasodilatadora por inhibición de las ERO y por lo tanto de la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico. Por otra parte, Roghani y Baluchnejadmojarad (2006) encontraron que el flavonoide antioxidante quercetina induce relajación en arterias de rata precontraídas con NA a través de un mecanismo que involucra el cierre de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, de modo tal que este sería otro mecanismo posible que explicaría la capacidad vasodilatadora del ZpE y sus flavonoides.

Al mejorar el proceso de relajación vascular, los flavonoides también pueden prevenir la disfunción endotelial (Ghosh y Scheepens, 2009; Tapas y col., 2008). Por esto, se estudió el efecto *in vitro* del ZpE y sus principales flavonoides sobre la respuesta a la Ach, vasodilatador dependiente de endotelio. La preincubación de arterias aisladas con diferentes concentraciones del ZpE, DHC, HF o DHF no causó ningún efecto sobre R_{max} a Ach en ninguno de los grupos dietarios. Sin embargo, las arterias de conejos alimentados con DH preincubadas con ZpE y HF, en todas las concentraciones estudiadas, o con las concentraciones más bajas de DHC y DHF (10^{-9} y 10^{-7} M) mejoró la sensibilidad (pEC_{50}) a la Ach, es decir que con concentraciones más bajas de Ach se alcanza la misma respuesta que la observada en las arterias incubadas con el vehículo. Incluso mejoraron la sensibilidad a Ach con respecto a las arterias de conejos con DC tratadas con el vehículo. Estos resultados evidencian que los flavonoides estudiados presentes en ZpE tienen efectos beneficiosos sobre la disfunción endotelial inducida por una DH. En este sentido, Abdullaev y col. (2018) encontraron que el flavonoide antioxidante quercetina, a diferencia del ácido cafeico o del resveratrol, incrementó la relajación provocada por Ach por un mecanismo que implicaría una disminución de ERO e incremento en la biodisponibilidad de NO. Sin embargo, Ajay y col. (2007) demostraron que una flavona no antioxidante aumentó la relajación vascular dependiente del endotelio inducida por Ach en aorta aislada de ratas diabéticas y espontáneamente hipertensas. El mecanismo de dicho efecto involucraría un aumento en la expresión de la NOS endotelial y por lo tanto en la producción de NO. En ambos casos la mejora de la función endotelial involucró aumento en la biodisponibilidad de NO.

Para evaluar el efecto *in vitro* del ZpE y sus flavonoides sobre la reactividad vascular se estudió la respuesta a los agonistas contráctiles Phe y Ang II. Encontramos que concentraciones bajas del ZpE y DHC atenuaron la contracción inducida por Phe en las arterias de conejos de ambos grupos de dieta, y a la concentración más alta estudiada disminuyeron la respuesta del grupo DH respecto al grupo DC con el mismo tratamiento. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Duarte y col. (1993) quienes demostraron que los flavonoides

inhiben las contracciones inducidas por NA, siendo los flavonoles (quercetina, kaempferol, pentametilquercetin) más potentes que las flavonas (luteolina, apigenina) y estas que los flavonoles [(+)-catequina, (-)-epicatequina], los cuales se relacionan a su vez con su potencia para inhibir la proteína kinasa C. A su vez Chan y col. (2000) estudiaron la relación estructura-actividad de flavonoles y flavonas, encontrando que la sustitución por un hidroxilo en el carbono 3 que caracteriza a los flavonoles es importante para estimular la relajación dependiente de endotelio, mientras que la ausencia de sustitución en el anillo fenólico A mejora el efecto relajante. Herrera y col. (1996) y Dong y col. (2010) informaron resultados similares de los efectos de los flavonoides sobre la respuesta contráctil a la Phe.

En cuanto al efecto del ZpE y sus principales flavonoides sobre la respuesta contráctil inducida por Ang II, un hallazgo importante y original del ensayo *in vitro* fue que desplazaron significativamente hacia la derecha la CCR a Ang II en las arterias de los conejos alimentados con DH, lo que indica una pérdida de sensibilidad o potencia (se requiere una concentración mayor del agonista contráctil para producir el mismo efecto que en las arterias tratadas con el vehículo). Estos resultados sugieren que los flavonoides de esta planta podrían de alguna manera interactuar con el receptor de Ang II. Este efecto fue concentración-dependiente: la mayor concentración estudiada del ZpE redujo la R_{max} a Ang II actuando como un antagonista no competitivo. Concentraciones bajas (10^{-9} y 10^{-7} M) de DHC y DHF causaron un desplazamiento hacia la derecha de la CCR a Ang II sin afectar la R_{max} , actuando como antagonistas competitivos, mientras que la mayor concentración de DHC y DHF redujo la R_{max} y a su vez provocó un desplazamiento no paralelo a la derecha de la CCR a Ang II comportándose como un antagonista mixto. Jerez y col. (2008) demostraron la existencia de una interacción cruzada (cross talk) entre los receptores AT_1 de Ang II y los receptores adrenérgicos α_1 en aorta aislada de conejo. Esta interacción se modifica en condiciones de hipercolesterolemia (Jerez y col., 2010). Un fenómeno similar podría explicar la observación de que ZpE y DHC a altas concentraciones inhiban significativamente tanto la respuesta contráctil a la Ang II como la respuesta a Phe en conejos alimentados con DH.

Considerando la relación estructura-actividad de los flavonoides (Duarte y col., 1993; Herrera y col., 1996; Dong y col., 2010), la ausencia de efecto de HF sobre la respuesta contráctil inducida por Ang II sugiere, además, que la presencia de doble sustitución de OH podría ser un requerimiento necesario para ejercer un antagonismo sobre la Ang II.

El estudio de los efectos de flavonoides sobre el SRA se ha limitado a caracterizar sus propiedades como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (Balasuriya y Vasantha Rupasinghe, 2011). Actualmente, ningún dato de la literatura refiere efectos específicos de flavonoides como antagonistas de la Ang II en el receptor AT_1 . Las membranas

plasmáticas de las células del MLV son altamente sensibles al enriquecimiento con colesterol, y este aumento en el contenido de colesterol en la membrana mejora los niveles de Ca^{2+} citosólico (Gleason y col., 1991), lo cual se asocia con un aumento en la contractilidad vascular, como se mencionó previamente. Asimismo, el aumento de colesterol en las membranas se asocia con disminución de la fluidez y estas alteraciones en la composición de las membranas lipídicas pueden estar implicadas en las modificaciones funcionales de la interacción agonista-receptor y en la capacidad de respuesta que se ha encontrado durante condiciones hipercolesterolémicas (Gleason y col., 1991). Por lo tanto, considerando que el ZpE y sus flavonoides tienen un efecto antagónico sobre la respuesta contráctil a la Ang II en conejos hipercolesterolémicos pero no en animales normocolesterolémicos, se puede hipotetizar que en el estado de hipercolesterolemia se altera la funcionalidad o conformación del receptor de Ang II y por lo tanto se sensibiliza al efecto del ZpE, DHC y DHF. Se necesitan más estudios para probar esta hipótesis, lo cual forma parte de las proyecciones de esta tesis.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* demostraron que ZpE y sus principales flavonoides tienen efecto benéfico sobre la función vascular en animales hipercolesterolémicos (presentan actividad vasodilatadora, sensibilizan a la Ach, disminuyen la respuesta contráctil a la Phe y antagonizan la respuesta a la Ang II), se caracterizó el efecto de la administración oral del ZpE en el modelo de hipercolesterolemia inducido por una dieta rica en colesterol. En primer lugar y para cumplir con las recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de drogas o preparados vegetales de la ANMAT, el ZpE se estandarizó desde el punto de vista fitoquímico de acuerdo al contenido de marcadores activos (aquellos con actividad terapéutica conocida) que fueron cuantificados por técnica cromatográfica (HPLC-DAD). Los compuestos que se identificaron en mayor cantidad fueron 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (DHMC) y 2',4'-dihidroxichalcona (DHC), los que fueron considerados marcadores activos y analíticos del ZpE. Estos resultados son similares a los obtenidos por Svetaz y col. (2004), Isla y col. (2016) y por Nuño y col. (2016).

A continuación se realizó un estudio sobre un rango de dosis (2,5 - 5 - 10 mg EAG/día) administrado oralmente a conejos con DC. Se eligieron estas dosis usando como referencia a Zampini y col. (2012) quienes en un modelo de ratón usaron dosis orales de 0,25 - 0,5 - 1 mg EAG/individuo. Asimismo, considerando las propiedades demostradas en el estudio *in vitro* del ZpE y sus flavonoides como antagonistas de la Ang II, se tuvo en cuenta las dosis terapéuticas de los antagonistas AT1 ampliamente usados en la clínica de la hipertensión arterial en humanos (losartan, ibersartan, valsartan, candesartan, telmisartan): entre 10 y 300 mg (equivalentes a 0,15

y 4,3 mg/kg de peso) que fueron ajustados al tamaño corporal y a la velocidad metabólica de nuestro modelo experimental.

La dosis 2,5 mg EAG/día fue la elegida para ser administrada a los conejos del modelo hipercolesterolémico ya que se observó que en los animales alimentados con DC no modificaba las variables hepáticas, renales, hematológicas o clínicas y que producía disminución significativa del CT (siempre dentro de los niveles fisiológicos). Asimismo, en relación a su efecto sobre la función vascular se observó que la dosis 2,5 mg EAG/día aumentó la sensibilidad a Ach y desensibilizó la respuesta contráctil a Ang II y NA.

En cuanto a la toxicidad del ZpE, la administración durante seis semanas no generó signos de toxicidad crónica ya que no se observaron casos de sedación, prurito, anomalías en el comportamiento ni mortalidad; tampoco hubo diferencias respecto al grupo control administrado con el vehículo en el peso corporal, el tamaño de los órganos (corazón, riñón, hígado), la función hepática y renal o los parámetros hematológicos. En este sentido, Zampini y col. (2008) demostraron en estudios previos *in vitro* la ausencia de toxicidad del ZpE.

Uno de los hallazgos más importantes del presente trabajo fue que la administración oral diaria de ZpE a animales que simultáneamente recibieron DH redujo significativamente los niveles de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) en aproximadamente un 65 % y 50 %, respectivamente. Los efectos del tratamiento con el ZpE y su control positivo la rosuvastatina fueron similares en casi todos los parámetros clínicos y bioquímicos, excepto en los niveles de CT: se observó que rosuvastatina no redujo los valores de CT. Li y col. (2016) demostraron que la rosuvastatina (1,5 mg/kg/día) reduce en un 30 % el CT y LDL-C en conejos alimentados con DH. Sin embargo, estos autores no encontraron aumento en los niveles de TG en los animales con DH. Esta diferencia en el perfil lipídico de ambos modelos podría explicar la diferencia con nuestros resultados. Por otra parte, la rosuvastatina siendo la droga que se emplea como referencia (gold standard) para el tratamiento de la hipercolesterolemia, es un inhibidor de la síntesis de colesterol endógeno (inhibe la enzima HMGR). Considerando que en el modelo hipercolesterolémico usado en el presente trabajo de tesis, la absorción de colesterol estaría incrementada por la dieta, y de acuerdo a lo descrito previamente en *antecedentes* sobre la homeostasis del colesterol (Alfonso y col., 2018), en estas condiciones la enzima HMGR que regula la síntesis de colesterol endógeno estaría inhibida, y este sería el motivo por el cual la rosuvastatina carece de efecto hipocolesterolémico en nuestro modelo.

La capacidad de los flavonoides como hipolipemiantes ha sido ampliamente descrita en la literatura, lo que sugiere la efectividad de estos compuestos para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis (Rajanandh y col., 2012; Koshy y col., 2001; Salvamani y col., 2014). En el análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico estandarizado de *Zuccagnia*

punctata realizado en el presente trabajo encontramos, en concordancia con los datos de la bibliografía (Agüero y col., 2010; Moreno y col., 2015a; Nuño y col., 2016), que los componentes dominantes de las partes aéreas de *Z. punctata* son chalconas (DHC y DMHC). Recientemente, varios autores demostraron que chalconas con diversas estructuras químicas tienen propiedades hipolipemiantes. En este sentido, se ha identificado un gran número de dianas terapéuticas que están directamente relacionadas con la síntesis, la transferencia y el metabolismo de los lípidos (Mahapatra y Bharti, 2016).

Un hallazgo interesante del presente trabajo es que el efecto hipocolesterolémico del ZpE se observó en ambos modelos dietarios: tanto en los conejos alimentados con DC, como así también en los animales alimentados con DH. Uno de los mecanismos posibles que explicaría este efecto dual es la inhibición de la enzima ACAT. Esta enzima cumple un rol muy importante en células de la mucosa intestinal, hepatocitos y macrófagos humanos. En el intestino delgado, la ACAT₂ desempeña un papel importante en la absorción de colesterol de la dieta (Sliskovic y White, 1991) ya que crea en las células intestinales un gradiente que favorece la difusión de colesterol libre a través de la membrana (Wilson y Rudel, 1994). En el hepatocito, los ésteres de colesterol son hidrolizados por la hidrolasa de ésteres de colesterol lisosomal (CEH), formándose de nuevo colesterol libre. Este es reesterificado por la ACAT (en el hígado la isoforma mayoritaria es la ACAT₁) y se forman ésteres de colesterol, que se ensamblan con fosfolípidos (PL), TG y Apo B, originando las VLDL-C. Una vez secretadas, estas se transforman en LDL-C, las cuales después de experimentar modificaciones oxidativas (LDL_{ox}), pueden ser captadas por receptores scavenger del macrófago (SRA, CD36). Una vez en el interior del macrófago, los ésteres de colesterol que aportan las LDL_{ox} se hidrolizan y originan colesterol libre. Para evitar su acumulación -ya que es citotóxico- este es de nuevo esterificado y almacenado en el citosol en forma de éster de colesterol. En el interior de los macrófagos y los hepatocitos, el colesterol entra en un ciclo de esterificación/hidrólisis, procesos catalizados por la ACAT y por la hidrolasa neutra de ésteres de colesterol (CEHN), conocido como “ciclo de los ésteres de colesterol”. Por todo esto, la inhibición de la enzima ACAT constituye una interesante diana terapéutica, ya que la reducción de esterificación intestinal de colesterol, junto con la disminución en la síntesis hepática de VLDL-C y la aceleración de la excreción de colesterol en la bilis (como tal o tras su conversión en ácidos biliares), originan una reducción de los valores plasmáticos de colesterol, lo que corresponde a una acción hipocolesterolémica indirecta; y la inhibición de la acumulación de colesterol en las células de la pared arterial y en los macrófagos, supone un efecto hipocolesterolémico directo. En este sentido, Choi y col. (2008) encontraron una importante inhibición no competitiva de ACAT mediada por el extracto etanólico de *Psoralea corylifolia* Linn. Por fraccionamiento guiado, los autores aislaron e identificaron a una chalcona como

principio activo, la isobavachalcona. Este compuesto inhibió el sistema de ensayo de ACAT usando microsomas de hígado de rata. Esta chalcona también disminuyó las formaciones de ésteres de colesterol en células HepG2. Por lo tanto, el ZpE podría ejercer un efecto similar, directo sobre animales con DH (absorción intestinal de colesterol) e indirecto sobre animales con DC (síntesis hepática de colesterol).

En conejos alimentados con una dieta rica en colesterol se observó un incremento en los niveles plasmáticos de TG (Karbiner y col., 2013; Alarcon y col., 2018). Los mecanismos involucrados en este fenómeno no están completamente dilucidados e incluso algunos autores encontraron valores normales de TG en animales alimentados exclusivamente con una dieta rica en colesterol (De las Heras y col., 2003). Un mecanismo probable sería la interferencia con la absorción de TG ya sea por inhibición de la DGAT o de la LP. Existe bibliografía que respalda el efecto de chalconas sobre la disminución en los niveles de TG. Los TG se absorben en el intestino delgado y se transportan a los tejidos donde se almacenan como grasa, que sirve como fuente de energía. En el intestino delgado, se requiere DGAT para la absorción de TG de la dieta. En el hígado, la DGAT juega un rol importante y significativo en la síntesis de TG a partir de ácidos grasos sintetizados de novo o de ácidos grasos extraídos de la circulación. Los TG se sintetizan en el citosol de las células adiposas a partir de glicerol-3-fosfato y Acil-CoA en presencia de DGAT (Yen y col., 2008). Un alto contenido de TG en sangre a menudo se produce por un aumento de la lipólisis, aumentando el riesgo de aterosclerosis y de enfermedades coronarias. Este riesgo se amplifica aún más por la presencia de otros factores como el tabaquismo, el nivel elevado de colesterol en la sangre, la presión arterial alta, la obesidad y el estilo de vida (Hollister y col., 1967). Respecto a la disminución en los niveles de TG en el grupo alimentado con DH tratado con ZpE, Casaschi y col. (2004) examinaron el papel de una chalcona vegetal, xanthohumol, en la síntesis y secreción de apo-lipoproteína B (apoB) y TG, usando células HepG2 como sistema modelo. Los autores informaron que el xanthohumol disminuyó la secreción de apoB de una manera dependiente de la dosis, tanto en condiciones basales como ricas en lípidos (hasta 43%). Esta disminución se asoció con un aumento de la degradación de la apoB celular, la inhibición de la síntesis de TG en la membrana microsómica y la transferencia de este TG recién sintetizado a la luz microsomal (disminución de 26 y 64%, respectivamente, en condiciones ricas en lípidos), lo que indica que la disponibilidad de TG es un factor determinante en la regulación de la secreción de apoB en las condiciones experimentales. La inhibición de la síntesis de TG fue causada por una reducción en la actividad de DGAT, que se correlacionó con una disminución en la expresión de ARNm de DGAT-1. La proteína de transferencia microsomal de triglicéridos (MTP) también puede controlar la

velocidad de transferencia de TG desde la membrana microsómica al conjunto luminal activo. El xanthohumol disminuyó la actividad de MTP de una manera dependiente de la dosis (hasta 30 %). Asimismo, la inhibición de DGAT conduce a una formación y absorción reducidas de TG. Las chalconas xanthohumol y xanthohumol B aisladas a partir de extracto de lúpulo (*Humulus lupulus* Linn) inhibieron la actividad de DGAT (Tabata y col., 1997).

Otro mecanismo que podría explicar la disminución de TG al realizar el tratamiento con el ZpE, es la inhibición de la LP. Esta es una enzima lipolítica secretada por el páncreas que al hidrolizar los enlaces éster de los TG en monoglicéridos y ácidos grasos libres, juega un papel clave en la absorción de grasa en la dieta. La inhibición de la LP conduce a una menor absorción de TG de la dieta en el intestino (Lunagariya y col., 2014). Cuando se bloquea la actividad de la LP, los TG de la dieta no se hidrolizan en ácidos grasos libres absorbibles y se excretan sin digerir. En este sentido, Birari y col. (2011) estudiaron el efecto *in vitro* de chalconas hidroxiladas y sus diglucósidos aislados de raíces de *Glycyrrhiza glabra* Linn. sobre la actividad de la LP. Tanto las chalconas como sus híbridos glucosídicos mostraron una fuerte inhibición contra la LP. El análisis de binding mostró un elevado potencial de unión de los compuestos hacia el sitio activo de la LP. La sustitución por 2',4'-dihidroxi en el anillo A y la sustitución de 3- o 4-hidroxi en el anillo B es esencial para la inhibición de LP (Nguyen y col., 2013). Considerando que los principales compuestos aislados de ZpE son DHC y DHMC, y que presentan grupos hidroxilos en posición 2 y 4 del anillo A y la flavona DHF (presente en el ZpE en menor cantidad) tiene dos grupos OH en la posición 3 y 7 del anillo B, podemos hipotetizar que el ZpE reduce los niveles plasmáticos de TG por inhibición de la LP.

También hay tener en cuenta que la reducción en los niveles de TG plasmáticos podría ser un efecto indirecto de la reducción de colesterol plasmático. En este sentido Goldstein y Brown (1987) han demostrado que el incremento en los valores de colesterol produce disminución de los LDLr, aumentando los niveles de LDL-C. Teniendo en cuenta que la LPL es la principal enzima que regula los niveles de TG plasmáticos (Alpers, 2008) y que la misma se une a los LDLr para activar su propiedad catalítica (Medh y col., 1996), podemos inferir que la disminución en los LDLr implica reducción en la actividad de la LPL e incremento en los valores de TG plasmáticos. Considerando que el ZpE reduce los niveles de colesterol, este mecanismo de down regulation de los LDLr estaría también reducido. Con respecto a la rosuvastatina, que no disminuyó los valores de colesterol pero si de TG en nuestro trabajo experimental, estudios clínicos han demostrado que las estatinas tienen un efecto *per se* sobre los niveles de TG independiente de su capacidad para inhibir la HMG-CoA reductasa (Ginsberg, 1998).

Un desequilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes es el mecanismo básico que conduce al estrés oxidativo y que contribuye a la etiología y progresión de la aterosclerosis (Singh y col., 2015). En conejos hipercolesterolémicos se ha observado alteración de la función endotelial inducida por la producción aumentada de ERO (Ohara y col., 1993; Voguel y col., 1998). Bajo condiciones de estrés oxidativo, el exceso de O_2^- reacciona con NO para formar peroxinitritos ($ONOO^-$), una molécula muy reactiva que altera la vasodilatación dependiente de NO. Estudios previos demostraron efectos beneficiosos de los flavonoides sobre la función endotelial (Machha y Mustafa, 2005; Hodgson y Croft, 2006), en algunos casos derivados de sus propiedades antioxidantes (Mugge y col., 1991; Papageorgiou y col., 2013). Teniendo en cuenta que los principales flavonoides presentes en ZpE, DHC y DHMC, son potentes antioxidantes y secuestradores de ERO (Moran Vieyra y col., 2009; Moreno y col., 2015b), la mejoría en la relajación mediada por la Ach en la aorta de los conejos con DH tratados con el ZpE tanto *in vitro* como *in vivo* podrían atribuirse a las acciones antioxidantes que contribuirían a restablecer la función endotelial. El hecho de que no se observaran cambios en la respuesta al NP -vasodilatador independiente de endotelio- en la aorta de ambos grupos de dieta tratados con el ZpE reafirmaría esta hipótesis. En este sentido y teniendo en cuenta que previamente se demostró incremento del estrés oxidativo sistémico en el modelo experimental empleado (Karbiner y col., 2013) se estudió el efecto de la administración oral de ZpE sobre parámetros de estrés oxidativo (Tbars y relación GSH/GSSG). Encontramos que la administración oral de 2,5 mg EAG/día del ZpE redujo los niveles séricos de TBARS e incrementó la relación GSH/GSSG, lo que sugiere una disminución del estrés oxidativo. Por otra parte se ha demostrado que algunos flavonoides aumentan la actividad de la NOS endotelial (Olszanecki y col., 2002; Duarte y col., 2014). Considerando que el tratamiento con el ZpE aumentó la sensibilidad a la Ach en ambos grupos de dieta, el aumento en la actividad de la NOS endotelial explicaría que se requiera una menor concentración de Ach para lograr la misma respuesta relajante. En conejos con DH este mecanismo sería adicional a los efectos antioxidantes discutidos previamente y en conjunto pueden contribuir a la mayor eficiencia observada.

Uno de los cambios morfológicos característicos de la aterosclerosis es un aumento de la relación íntima/media. Previamente, encontramos un aumento de este índice en la aorta de conejos alimentados con DH (Sierra y col., 2015). Los datos epidemiológicos han demostrado una clara correlación entre este parámetro y la ECV. Por lo tanto, la relación íntima/media sería un marcador temprano de aterosclerosis (Campuzano y col., 2003). El tratamiento con el ZpE, así como con rosuvastatina, redujo la relación íntima/media en aortas de conejos con DH a

valores observados en aortas de conejos con DC. De igual manera, y de acuerdo a lo encontrado por Zhang y col. (2005) observamos un incremento en el porcentaje del área sudanofílica (indicadora del depósito de lípidos en la pared arterial) en el cayado aórtico de conejos alimentados con DH, que fue prevenido por la administración oral de ZpE. Estos efectos sobre la morfología vascular respaldarían la hipótesis de que el tratamiento con ZpE mejora la función endotelial.

Teniendo en cuenta los efectos *in vitro* del ZpE y sus flavonoides sobre la reactividad vascular a los agonistas vasocontráctiles, uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la capacidad del tratamiento oral con el ZpE para prevenir las alteraciones en la respuesta vascular a los agonistas vasoconstrictores observadas en el modelo hipercolesterolémico. Nuestros resultados mostraron que la administración oral del ZpE desensibilizó significativamente la respuesta contráctil a la NA tanto en conejos con DC como en conejos con DH. El efecto de algunos flavonoides naturales como antagonistas del receptor adrenérgico α_1 fue descrito previamente (Ajay y col., 2003, Duarte y col., 1993; Li y col., 2011).

Como ya fue mencionado, la hipercolesterolemia induce alteraciones en la respuesta contráctil a Ang II (Jerez y col., 2008). La administración oral de ZpE tuvo un efecto dependiente de la dieta sobre la respuesta a la Ang II: se observó desensibilización en conejos alimentados con DC y reducción de la actividad intrínseca (R_{max}) en conejos alimentados con DH. La Ang II es un potente activador de la NADPH oxidasa, que libera aniones O_2^- incrementado así el estrés oxidativo (Nguyen Dinh Cat y col., 2013). Considerando que los flavonoides desempeñan un papel fundamental en la inhibición del anión O_2^- (Varga y col., 2001), el efecto de la administración de ZpE sobre la Ang II podría estar relacionado con la propiedad antioxidante del extracto que está constituido predominantemente por flavonoides. Este hallazgo coincide con lo observado en los estudios *in vitro* con el ZpE, en los cuáles se observó una disminución de la respuesta contráctil a la Ang II en la aorta de conejos alimentados con DH incubados con el extracto o con los flavonoides presentes en el mismo. Asimismo, la hipercolesterolemia puede generar una disfunción vascular cuyos mecanismos involucran aumento en la actividad de la COX inducida por liberación no compensada de ERO, fenómeno que produciría liberación de prostanoïdes vasoconstrictores e incremento de la respuesta contráctil a Ang II (Jerez y col., 2008). Teniendo en cuenta que se ha demostrado que los flavonoides de *Z. punctata* inhiben la actividad de la COX *in vitro* (Nuño y col., 2016), y a su vez presenta propiedades antioxidantes (Moreno y col., 2015b), la inhibición de la actividad de la COX unida a la mejora de la función endotelial por su efecto antioxidante sería el mecanismo por el cual el ZpE reduce la respuesta contráctil a la Ang II en conejos tratados con DH.

Aunque la Ro no mejoró la relajación a la Ach y aumentó la sensibilidad por la NA, tuvo la capacidad de reducir la respuesta contráctil de la Ang II. Estos datos, sumados al efecto nulo de la Ro en los niveles de CT y a la mejora que produjo en la relación íntima/media y en el porcentaje del área sudanofílica, pueden implicar un papel diferencial de los lípidos en la disfunción vascular. Son necesarios más estudios para comprender los mecanismos subyacentes de estos efectos.

Uno de los parámetros clínicos que se analizó fue la PAM. En trabajos previos (Alarcón y col., 2016) observamos que el agregado de colesterol a la dieta incrementa la PAM en aproximadamente un 20 %. La administración oral de ZpE a conejos alimentados con DH normalizó los valores de PAM. Una relación positiva entre la ingesta de colesterol en la dieta y la presión arterial sistólica también fue comunicada por Sakurai y col. (2011). Debido a que las mediciones de PAM se registraron al final del tratamiento, la reducción de la presión no fue causada por acciones vasodilatadoras agudas del ZpE. Considerando que el tratamiento con ZpE inhibió la vasoconstricción inducida por la estimulación de receptores vasculares fisiológicamente importantes en la regulación de la presión arterial, como los receptores adrenérgicos $\alpha 1$ y de Ang II, la reducción de la respuesta vasoconstrictora junto con su propiedad hipolipémica explicaría la reducción de la PAM inducida por el tratamiento con ZpE en conejos alimentados con DH. Asimismo, Kitiyakara y Wilcox, (1998) demostraron que la mejora de las vasodilataciones dependientes del endotelio a la Ach después de la administración de un antioxidante en forma crónica está asociada con disminuciones en la PAM. En este sentido, inhibidores a base de chalconas podrían tener una actividad prometedora en el control de la presión arterial. Sherman y col. (1968) informaron que la chalcona 2-(2-dimetilaminoetoxi)-3',4',5'-trimetoxichalcona es un agente antihipertensivo eficaz y de acción prolongada inhibiendo las contracciones inducidas por NA y Ang II en aorta aislada de perros y ratas, cuando se administró por vía intravenosa y oralmente.

En cuanto a las alteraciones hematológicas, Karbiner y col. (2013) encontraron que una DH genera alteraciones en los glóbulos rojos (GR) por el incremento del estado oxidativo, disminuyendo la fluidez de la membrana, alterando su permeabilidad y el sistema antioxidante. Esto conduce a un incremento en la hemólisis y la peroxidación de los lípidos de la membrana de los GR, que da como resultado disminución significativa en el Hto y la hemoglobina (Abdelhalim, 2010). La administración oral del ZpE a conejos con DH, normalizó el Hto. Este efecto podría explicarse por la reducción del CT y el estrés oxidativo.

Asimismo, Karbiner y col. (2013) observaron que la DH provoca un aumento en el número de leucocitos como respuesta a un estado inflamatorio. En este sentido, con la administración oral

de ZpE a conejos con DH, los niveles de leucocitos se redujeron hasta alcanzar valores normales. Teniendo en cuenta que la anemia y el estado inflamatorio han sido reconocidos recientemente como FRCV (Felker y col., 2004; Karbiner y col., 2013), los resultados del presente estudio respaldan el uso del ZpE en el tratamiento temprano de las alteraciones producidas por la hipercolesterolemia.

V- Conclusión:

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, podemos afirmar que el extracto hidroalcohólico de *Zuccagnia punctata*, rico en flavonoides, tiene efectos benéficos sobre la función vascular a través de mecanismos vasodilatadores y antagonistas de la Ang II. Además, cuando es administrado oralmente presenta propiedad hipocolesterolémica mejorando las variables bioquímicas, clínicas, hematológicas, los parámetros de estrés oxidativo y evita las alteraciones morfohistológicas observadas en el modelo hipercolesterolémico.

El estudio del efecto del extracto de *Z. punctata* y los flavonoides presentes en esta especie vegetal sobre la función vascular aporta información relevante sobre su efecto benéfico en la función vascular como producto fitoterápico para la prevención de FRCV relacionados con la hipercolesterolemia y la disfunción endotelial y supone un avance al conocimiento para el posterior uso de los mismos en la industria farmacéutica, con especial énfasis en el desarrollo regional.

VI- Bibliografía

1. Abdelhalim K, (2010). The potential influence of high cholesterol diet-induced oxidative stress on composition and properties of red blood cells in rabbits. *African Journal of Microbiology Research*, 4(9): 836-843.
2. Abdullaev S, Kozaeva L, Medvedev O, Ruuge E, (2018). Quercetin increases nitric oxide-dependent dilation in rat thoracic aorta. *Journal of Hypertension*, 36: 47.
3. Afonso M, Machado R, Lavrador M, Quintao E, Moore K, Lottenberg A, (2018). Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients*, 10(6): 760.
4. Agüero M, Gonzalez M, Lima B, Svetaz L, Sánchez M, Zacchino S, Egly Feresin G, Schmeda Hirschmann G, Palermo J, Wunderlin D, Tapia A, (2010). Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1): 194–201.
5. Ajay M, Achike FI, Mustafa MR, (2007). Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid. *Pharmacological Research*, 55: 385–391.
6. Ajay M, Gilani A, Mustafa M, (2003). Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, 74(5): 603-612.
7. Alarcón G, Roco J, Medina A, Van Nieuwenhove C, Medina M, Jerez S, (2016). Stearoyl-CoA desaturase indexes and n-6/n-3 fatty acids ratio as biomarkers of cardiometabolic risk factors in normal-weight rabbits fed high fat diets. *Journal of Biomedical Science*, 23(1). doi:10.1186/s12929-016-0235-6
8. Alpers D, (2008). Role of lipoprotein lipase in triglyceride metabolism: potential therapeutic target. *Future Lipidology*, 3(4): 385-397.
9. Altmann S, (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303(5661): 1201–1204.
10. Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez M, Schini-Kerth V, Laher I, (2012). Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 108(09): 1532–1549.
11. Aoki N, Muko M, Ohta E, Ohta S, (2008). C-geranylated chalcones from the stems of *Angelica keiskei* with superoxide-scavenging activity. *Journal of Natural Products*, 71(7): 1308–1310.

12. Badimon L y Vilahur G, (2012). LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1254: 18–32.
13. Bachschmid M, Schildknecht S, Ullrich V, (2005). Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1): 536–542.
14. Balasuriya B y Vasantha Rupasinghe H, (2011). Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Funcional Foods in Health and Disease*, 1(5): 172-188.
15. Bánsághi S, Golenár T, Madesh M, Csordás G, RamachandraRao S, Sharma K, Yule D, Joseph S, Hajnóczky G, (2014). Isoform- and species-specific control of inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP3) receptors by reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 289(12): 8170–8181.
16. Bays H, Tighe A, Sadovsky R, Davidson M, (2008). Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6(3): 391–409.
17. Beisiegel U, (1998). Lipoprotein metabolism. *European Heart Journal*, 19 (A): 20–23
18. Beretz A y Cazenave J, (1988). The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. *Progress in Clinical and Biological Research*, 280:187-200
19. Birari R, Gupta S, Mohan C, Bhutani K, (2011). Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: Experimental and computational studies. *Phytomedicine*, 18(8-9): 795-801.
20. Brodniewicz T y Gryniewicz G, (2012). Plant phenolics as drug leads - what is missing? *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(6): 1203-17.
21. Bukhari N, Butt A, Amjad M, Ahmad W, Shah V, Trivedi A, (2013). Synthesis and evaluation of chalcone analogues based pyrimidines as angiotensin converting enzyme inhibitors. *Pakistan Journal of Biological Science*, 16(21): 1368-1372.
22. Cabrera A (1971). Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 14: 1-42.
23. Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, Breschi M, Martinotti E, (2004). Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 370(4): 290–298.

24. Campuzano R, Moya J, García-Lledó A, Salido L, Guzmán G, Tomas JP, Catalán P, Muriel A, Asín E, (2003). Endothelial dysfunction and intima-media thickness in relation to cardiovascular risk factors in patients without clinical manifestations of atherosclerosis. *Revisa Española de Cardiología*, 56(6): 546-54.
25. Casaschi A, Maiyoh G, Rubio B, Li R, Adeli K, Theriault A, (2004). The chalcone xanthohumol inhibits triglyceride and apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *The Journal of Nutrition*, 134(6): 1340-1346.
26. Chan E, Pannangpetch P, Woodman O, (2000). Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35(2): 326-333.
27. Chen H, (2001). Molecular mechanisms of sterol absorptions. *The Journal of Nutrition*, 131(10): 2603–2605.
28. Chen G, Wang H, Zhang X, Yang S, (2014). Nutraceuticals and functional foods in the management of hyperlipidemia. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(9): 1180-1201.
29. Cheng Y, Sheen J, Hu W, Hung Y, (2017). Polyphenols and oxidative stress in atherosclerosis-related ischemic heart disease and stroke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–16.
30. Choi J, Rho M, Lee S, Choi J, Kim K, Song G, Kim Y, (2008). Bavachin and isobavachalcone, acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *Archives of Pharmacal Research*, 31(11): 1419–1423.
31. Cohen D, (2008). Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Lipidology*, 2(2): S1–S3.
32. Davis H y Veltri R, (2007). Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 14(3): 99-108.
33. Deanfield J, Halcox J, Rabelink T, (2007). Endothelial function and dysfunction. *Circulation*, 115(10): 1285-1295.
34. De la Rocha N, María A, Gianello J, Pelzer L, (2003). Cytoprotective effects of chalcones from *Zuccagnia punctata* and melatonin on the gastroduodenal tract in rats. *Pharmacological Research*, 48(1): 97-99.
35. De las Heras N, Cediél E, Oubinn M, Arangoncillo P, Sanz-Rosa D, Lahera V, Cachofeiro V, (2003). Comparison between the effects of mixed dyslipidaemia and

- hypercholesterolaemia on endothelial function, atherosclerotic lesions and fibrinolysis in rabbits. *Clinical Science*, 104(4): 357–365.
36. Dong X, Du L, Pan Z, Liu T, Yang B, Hu Y, (2010). Synthesis and biological evaluation of novel hybrid chalcone derivatives as vasorelaxant agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9): 3986–3992.
 37. Duane W, (1995). Serum lathosterol levels in human subjects reflect changes in whole body cholesterol synthesis induced by lovastatin but not dietary cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 36(2): 343-348.
 38. Duarte J, Pérez Vizcaíno F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A, (1993). Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology*, 24(4): 857-862.
 39. Duarte J, Francisco V, Perez-Vizcaino F, (2014). Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food and Function*, 5(8): 1653-1668.
 40. Dzau V, Antman E, Black H, Hayes D, Manson J, Plutzky J, Popma J, Stevenson W, (2006). The Cardiovascular Disease Continuum Validated: Clinical Evidence of Improved Patient Outcomes: Part I: Pathophysiology and Clinical Trial Evidence (Risk Factors Through Stable Coronary Artery Disease). *Circulation*, 114(25): 2850–2870.
 41. Edwards R, Lyon T, Litwin S, Rabovsky A, Symons J, Jalili T, (2007). Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *The Journal of Nutrition*, 137(11): 2405–2411.
 42. EMA, (2010). Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Available at http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003272.pdf. Accessed in December 2015.
 43. Espenshade P y Hughes A, (2007). Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 41(1): 401-427.
 44. Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen Y, (2015). Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology and Therapeutics*, 146: 104–119
 45. Felker G, Adams K, Gattis W, O'Connor C, (2004). Anemia as a risk factor and therapeutic target in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(5): 959-966.

46. Farmacopea Argentina. Codex Medicamentarius Argentino (2003), 7ta ed. Buenos Aires, Argentina; (c) Resolución N° 5418 ANMAT *Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica*
47. Fernández C, Martín M, Gómez-Coronado D, Lasunción M, (2005). Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *Journal of Lipid Research*, 46(5): 920–929.
48. Fernandez M, (2001). Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *The Journal of Nutrition*, 131(1): 10–20.
49. Foudi N, Norel X, Rienzo M, Louedec L, Brink C, Michel J, Bäck M, (2009). Altered reactivity to norepinephrine through COX-2 induction by vascular injury in hypercholesterolemic rabbits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(5): 1882-1888.
50. Geleijnse J, Giltay E, Grobbee D, Donders A, Kok F, (2002). Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *Journal of Hypertension*, 20(8):1493-1499.
51. Ghosh D y Scheepens A, (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(3): 322-331.
52. Ginsberg H, (1998). Effects of statins on triglyceride metabolism. *The American Journal of Cardiology*, 81(4A): 32B–35B.
53. Gleason M, Medow M, Tulenko T, (1991). Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circulation Research*, 69(1): 216-227.
54. Goldstein J y Brown M, (1987). Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76(3): 504-507.
55. Gylling H, (2004). Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia. *International Journal of Clinical Practice*, 58(9): 859-866.
56. Hawes B, O'Neill K, Yao X, Crona J, Davis H, Graziano M, Altmann S, (2007). In vivo responsiveness to ezetimibe correlates with niemann-pick C1 like-1 (NPC1L1) binding affinity: comparison of multiple species NPC1L1 orthologs. *Molecular Pharmacology*, 71(1): 19-29.

57. Herrera M, Zarzuelo A, Jiménez J, Marhuenda E, Duarte J, (1996). Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. *General Pharmacology*, 27(2): 273-277.
58. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K, (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 47(5): 357-62.
59. Hirata H, Takazumi K, Segawa S, Okada Y, Kobayashi N, Shigyo T, Chiba H, (2012). Xanthohumol, a prenylated chalcone from *Humulus lupulus* L., inhibits cholesteryl ester transfer protein. *Food Chemistry*, 134(3): 1432-1437.
60. Hodgson J y Croft K, (2006). Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(15): 2492-2498.
61. Hollister L, Overall J, Snow H, (1967). Relationship of obesity to serum triglyceride, cholesterol, and uric acid, and to plasma-glucose levels. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 20(7): 777-782.
62. Hooper L, Kroon P, Rimm E, Cohn J, Harvey I, Le Cornu K, Ryder J, Hall W, Cassidy A, (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1): 38-50.
63. Horton J, Goldstein J, Brown M, (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*, 109(9): 112-1131.
64. Hu X, Steffensen K, Jiang Z, Parini P, Gustafsson J, Gåfvæls M, Eggertsen G, (2012). LXR β activation increases intestinal cholesterol absorption, leading to an atherogenic lipoprotein profile. *Journal of Internal Medicine*, 272(5): 452-464.
65. Huxley R y Neil H, (2003). The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(8): 904-908.
66. Ikonen E, (2018). Mechanisms of cellular cholesterol compartmentalization: recent insights. *Current Opinion in Cell Biology*, 53: 77-83.
67. Ikonen E, (2006). Mechanism for cellular cholesterol transport: defect and human disease. *Physiological reviews*, 86(4): 1237-1261.
68. Insull W, (2006). Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *Southern Medical Journal*, 99(3): 257-273.
69. Iqbal J y Hussain M, (2009). Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(6): 1183-1194.

70. Isla M, Moreno M, Nuño G, Rodriguez I, Carabajal M, Alberto M, Zampini I, (2016). *Zuccagnia punctata*: a review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Natural Product Communications*, 11: 1749-1755.
71. Isla M, Salas A, Danert F, Zampini I, Ordoñez R, (2014). Analytical methodology optimization to estimate the content of non-flavonoid phenolic compounds in Argentine propolis extracts. *Pharmaceutical Biology*, 52(7): 835-840.
72. Israf D, Khaizurin T, Syahida A, Lajis N, Khozirah S, (2007). Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF- κ B nuclear translocation and I κ -B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. *Molecular Immunology*, 44(5): 673-679.
73. Jespersen B, Tykocki N, Watts S, Cobbett P, (2015). Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research. *Journal of Visualized Experiments*, (95). doi:10.3791/52324
74. Jerez S, Peral de Bruno M, Coviello A, (2005). Nitric oxide modulates angiotensin II-induced endothelial vasoconstrictor prostanoid release. *European Journal of Pharmacology*, 520(1-3): 127-134.
75. Jerez S, Sierra L, Coviello A, Peral M, (2008). Endothelial dysfunction and improvement of the angiotensin II-reactivity in hypercholesterolemic rabbits: role of cyclooxygenase metabolites. *European Journal of Pharmacology*, 580 (1-2): 182-189.
76. Jerez S, Sierra L, Scacchi F, de Bruno M, (2010). Hypercholesterolemia modifies angiotensin II desensitisation and cross talk between α 1-adrenoceptor and angiotensin AT1 receptor in rabbit aorta. *European Journal of Pharmacology*, 635(1-3): 149-155.
77. Ji X, Wu B, Zhou Z, Kang D, Lee H, Cho K, Jin S, Wen J, (2017). Mechanisms of vasodilatory effects of total flavonoids from *Euphorbia humifusa* in rat aorta. *The FASEB Journal*, 31(1): 835.13.
78. Kantevari S, Addla D, Bagul P, Sridhar B, Banerjee S, (2011). Synthesis and evaluation of novel 2-butyl-4-chloro-1-methylimidazole embedded chalcones and pyrazoles as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(16): 4772-4781.
79. Karnik R, (2001). The value of lipid lowering in patients with coronary heart disease. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*, 4(1): 31-34.
80. Karbiner M, Sierra L, Minahk C, Fonio M, Bruno M, Jerez S, (2013). The role of oxidative stress in alterations of hematological parameters and inflammatory markers induced by early hypercholesterolemia. *Life Sciences*, 93(15): 503-508.

81. Kiselyov K y Muallem S, (2016). ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium*, 60(2): 108-114.
82. Kitiyakara C y Wilcox C, (1998). Antioxidants for hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 7(5): 531-538.
83. Koshy A, Anila L, Vijayalakshmi N, (2001). Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats. *Food Chemistry*, 72(3): 289-294.
84. Kolodgie F, Katocs A, Largis E, Wrenn S, Cornhill J, Herderick E, Lee S, Virmani R., (1996). Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 16(12): 1454-1464.
85. Kumar S y Pandey A, (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 1–16.
86. Laughton M, Halliwell B, Evans P, Houlst J, (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology*, 38(17): 2859-2865.
87. Li W, Du L, Li M, (2011). Alkaloids and flavonoids as $\alpha(1)$ -adrenergic receptor antagonists. *Current Medicinal Chemistry*, 18(32): 4923-4932.
88. Li Z, Wang L, Hu X, Zhang P, Chen Y, Liu X, Xu M, Zhang Y, Zhang M, (2016). Effect of rosuvastatin on atherosclerotic plaque stability: an intravascular ultrasound elastography study. *Atherosclerosis*, 248: 27-35.
89. Loke W, Proudfoot J, Hodgson J, McKinley A, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft K, (2010). Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(4): 749-757.
90. Lunagariya N, Patel N, Jagtap S, Bhutani K, (2014). Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 13: 897-921.
91. Machha A y Mustafa M, (2005). Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46 (1): 36-40.
92. Mahapatra D y Bharti S, (2016). Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sciences*, 148: 154-172.

93. McMurry M, Connor W, Lin D, Cerqueira M, Connor S, (1985). The absorption of cholesterol and the sterol balance in the Tarahumara Indians of Mexico fed cholesterol-free and high cholesterol diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 41(6): 1289-1298.
94. Medh J, Bowen S, Fry G, Ruben S, Andracki M, Inoue I, Lalouel M, Strickland D, Chappell D, (1996). Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(29): 17073-17080.
95. Medina M, Alberto M, Sierra L, Van Nieuwenhove C, Saad S, Isla M, Jerez S, (2014). Hypercholesterolemia increases plasma saturated and n-6 fatty acids altering prostaglandin homeostasis and promotes endothelial dysfunction in rabbits. *Lipids*, 49(7): 685-693.
96. Mehta P y Griendling K, (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1): 82-97.
97. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T, (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4): 673-751.
98. Millatt L, Bocher V, Fruchart J, Staels B, (2003). Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1631(2): 107-118.
99. Ministerio de Salud de la Nación, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, (2015). Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para Enfermedades No Transmisibles.
100. Morán Vieyra F, Boggetti H, Zampini I, Ordoñez R, Isla M, Alvarez R, De Rosso V, Mercadante A, Borsarelli C, (2009). Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally-related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. *Free Radical Research*, 43(6): 553-564.
101. Moreno M, Mercado M, Nuño G, Zampini I, Cuello A, Ponessa G, Sayago J, Isla M, (2015a). Histochemical localization and characterization of chalcones on the foliar surface of *Zuccagnia punctata* Cav. Insights into their physiological role. *Phytochemistry Letters*, 13: 134-140.
102. Moreno A, Nuño G, Cuello S, Sayago J, Alberto M, Zampini C, Isla M, (2015b). Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity characterization and toxicity

- studies of flowers of "Jarilla", a medicinal shrub from Argentina. *Natural Product Communications*, 10(6): 991-994.
103. Morgan A, Mooney K, Wilkinson S, Pickles N, Mc Auley M, (2016). Cholesterol metabolism: a review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Research Reviews*, 27: 108-124
 104. Mügge A, Elwell J, Peterson T, Harrison D, (1991). Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *The American Journal of Physiology*, 260(2): 219-25.
 105. Nelson R, (2013). Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Primary Care*, 40(1): 195-211.
 106. Nguyen Dinh Cat A, Montezano A, Burger, Touyz R, (2013). Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(10): 1110-1120.
 107. Nguyen T, Sawyer J, Kelley K, Davis M, Rudel L, (2011). Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *Journal of Lipid Research*, 53(1): 95-104.
 108. Nguyen H; Do T; Truong V; Thai K; Tran N; Tran T, (2013). Design, synthesis and biological evaluation of some chalcone derivatives as potential pancreatic lipase inhibitors. *The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry* (doi: 10.3390/ecsoc-17-b021).
 109. Nuño G, Alberto M, Arena M, Zampini I, Isla M, (2016). Effect of *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) extract on pro-inflammatory enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus aureus*. Toxicity studies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8): 1713-1719.
 110. Ohara Y, Peterson T, Harrison D, (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(6): 2546-2551.
 111. Olszanecki R, Gebaska A, Kozłowski V, Gryglewski R, (2002). Flavonoids and nitric oxide synthase. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 53(4): 571-584.
 112. Organización Mundial de la Salud, (2017). Enfermedades cardiovasculares. [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
 113. Papageorgiou N, Tousoulis D, Katsargyris A, Charakida M, Androulakis E, Siasos G, Tentolouris C, Stefanadis C, (2013). Antioxidant treatment and endothelial dysfunction: is it time for flavonoids?. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 8(2):81-92.
 114. Peng I y Kuo S, (2003). Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. *The Journal of Nutrition*, 133(7): 2184–2187.

115. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A, (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61(1): 67-75.
116. Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet, (2003). Anticancer potential of plants and natural products: a review. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 1(6): 104-115.
117. Rajanandh M, Satishkumar M, Elango K, Suresh B, (2012). *Moringa oleifera* Lam. A herbal medicine for hyperlipidemia: a pre-clinical report. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(2): 790-795.
118. Ratera E, Ratera M. (1980). Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Hemisferio S. (Ed.) Buenos Aires, Argentina, 189.
119. Roghani M y Baluchnejadmojarad T, (2006). Time-dependent changes in responsiveness of thoracic aorta of diabetic rats to quercetin. *Journal of Medicinal Plants*, 1(2): 17-22
120. Ros E, (2006). Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(G), 52–62.
121. Roth G, Fihn S, Mokdad A, Aekplakorn W, Hasegawa T, Lim S, (2011). High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 89(2): 92-101.
122. Rozmer Z y Perjési P, (2014). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 15: 87-120.
123. Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin N, Ahmad S, Shukor M, (2014). Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *BioMed Research International*, 1-11.
124. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten J, Metsios G, Carroll D, Kitas G, (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4: 302-312.
125. Sashidhara K, Palnati G, Sonkar R, Avula S, Awasthi C, Bhatia G, (2013). Coumarin chalcone fibrates: a new structural class of lipid lowering agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64: 422–431.
126. Segatto M, Trapani L, Marino M, Pallottini V, (2011). Age- and sex-related differences in extra-hepatic low-density lipoprotein receptor. *Journal of Cellular Physiology*, 226(10): 2610–2616.

127. Serrano M, Morte S, Álvarez V, Zugarramurdi P, Palacios M, (2001). The inflammatory process of cardiovascular disease: new markers. *ANALES Sis San Navarra*, 24(3): 315-326.
128. Sharma M, Ansari M, Abou-Setta A, Soares-Weiser K, Ooi T, Sears M, Moher D, (2009). Systematic review: comparative effectiveness and harms of combination therapy and monotherapy for dyslipidemia. *Annals of Internal Medicine*, 151(9): 622-630.
129. Sheng Y y Zhu L, (2018). The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 10(1): 17-28.
130. Sherman G, Packman E, Rossi G, (1968). Electrolyte Alterations in Vascular Smooth Muscle and Hypotensive Activity of a New Chalcone derivative. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(5): 733-737.
131. Sierra L, Roco J, Alarcon G, Medina M, Van Nieuwenhove C, Peral de Bruno M, Jerez S, (2015). Dietary intervention with *Salvia hispanica* (Chia) oil improves vascular function in rabbits under hypercholesterolaemic conditions. *Journal of Functional Foods*, 14: 641–649.
132. Silva G, Pereira A, Rezende B, da Silva J, Cruz, J, de Souza M, Gomes R, Teles Y, Cortes S, Lemos V, (2013). Mechanism of the antihypertensive and vasorelaxant effects of the flavonoid tiliroside in resistance arteries. *Planta Medica*, 79(12): 1003–1008.
133. Singh R, Devi S, Gollen R, (2015). Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 31(2): 113-126.
134. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventós R, (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
135. Sliskovic D y White A, (1991). Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and anti-atherosclerotic agents. *Trends in Pharmacological Science*, 12(5): 194-199.
136. Solorzano E, Bortolini C, Bogialli S, Di Gangi I, Favaro G, Maldonado L, Pastore P, (2017). Use of a LC-DAD-QTOF system for the characterization of the phenolic profile of the argentinean plant *Zuccagnia punctata* and of the related propolis: new biomarkers. *Journal of Functional Foods*, 33: 425–435.

137. Sakurai M, Stamler J, Miura K, Brown I., Nakagawa H, Elliott P, Ueshima H, Chan Q, Tzoulaki I, Dyer A, Okayama A, Zhao L, (2011). Relationship of dietary cholesterol to blood pressure: the INTERMAP study. *Journal of Hypertension*, 29(2): 222-228.
138. Sorensen K, Celermajer D, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge D, Deanfield J, (1994). Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familiar hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein levels. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(1): 50–55.
139. Srivastava S, Sonkar R, Mishra S, Tiwari A, Balramnavar V, Mir S, Bhatia G, Saxena K, Lakshmi V, (2013). Antidyslipidemic and antioxidant effects of novel lupeol-derived chalcones. *Lipids*, 48(10): 1017–1027.
140. Steinl D y Kaufmann B, (2015). Ultrasound Imaging for Risk Assessment in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 9749-9769.
141. Stevenson S, Sawyer J, Rudel L, (1992). Role of apolipoprotein E on cholesteryl ester-enriched low density lipoprotein particles in coronary artery atherosclerosis of hypercholesterolemic nonhuman primates. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 12(1): 28-40.
142. Sudhop T y von Bergmann K, (2002). Cholesterol absorption inhibitors for the treatment of hypercholesterolaemia. *Drugs*, 62(16): 2333–2347.
143. Sun Y, Zhao J, Jin H, Cao Y, Ming T, Zhang L, Hu M, Hamlati H, Pang S, Ma X, (2013). Vasorelaxant effects of the extracts and some flavonoids from the buds of *Coreopsis tinctoria*. *Pharmaceutical Biology*, 51(9): 1158–1164.
144. Svetaz L, Tapia A, López S, Furlán R, Petenatti E, Pioli R, Schmeda- Hirschmann G, Zacchino S, (2004). Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11): 3297–3300.
145. Tabata N, Ito M, Tomoda H, Omura S, (1997). Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 46(4): 683-687.
146. Tapas A, Sakarkar D, Kakde R, (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3): 1089-1099.
147. Tegos T, Kalodiki E, Sabetai M, Nicolaidis A, (2001). The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review. *Angiology*, 52(2): 89-98.
148. Temel R y Rudel L, (2007). Diet effects on atherosclerosis in mice. *Current Drug Targets*, 8(11):1150-1160.

149. Terao J, Yamaguchi S, Shirai M, Miyoshi M, Moon J, Oshima S, Inakuma T, Tsushida T, Kato Y, (2001). Protection by quercetin and quercetin 3-O- β -D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radical Research*, 35(6): 925–931.
150. Testai L, Martelli A, Cristofaro M, Breschi M, Calderone V, (2013). Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in langendorff-perfused rat hearts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(5): 750-756.
151. Torres-Piedra M, Figueroa M, Hernández-Abreu O, Ibarra-Barajas M, Navarrete-Vázquez G, Estrada-Soto S, (2011). Vasorelaxant effect of flavonoids through calmodulin inhibition: ex vivo, in vitro, and in silico approaches. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(1): 542–546.
152. Toursarkissian M, (1980). *Plantas medicinales de la Argentina*. Editorial Hemisferio Sur, S.A., Buenos Aires, Argentina.
153. Touys R y Schiffrin E (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*, 52(4): 639-72.
154. Trapani L, Segato M, Pallottini V, (2012). Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic “power station”. *World Journal of Hepatology*, 4(6): 184-190.
155. Tsimidou M, (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 10(2): 99-116.
156. Turley S y Dietschy M, (1988). The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. In *The Liver: Biology and Pathobiology*, 617-41.
157. Turnbull J, Nakajima J, Welford R, Yamazaki M, Saito K, Schofield C, (2004). Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2): 1206–1216.
158. Varga Z, Czompa A, Kakuk G, Antus S. (2001). Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans. *Phytotherapy Research*, 15(7): 608-612.
159. Villar I, Francis S, Webb A, Hobbs A, Ahluwalia A, (2006). Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney International*, 70(5): 840–853.
160. Vogel R, Corretti M, Gellman J, (1998). Cholesterol, cholesterol lowering, and endothelial function. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 41(2): 117-136.

161. Walch L, Brink C, Norel X, (2001). The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. *Therapie*, 56: 223–226.
162. Wallace T, (2011). Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in Nutrition*, 2(1):1–7.
163. Wani S, Iqbal H, Basir S, (2017). Mechanism of flavonoids action in smooth muscle relaxation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 6(9): 514–550.
164. Warren J, Dimmitt S, Stampfer H, (2016). Cholesterol trials and mortality. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 82(1): 168–177.
165. Weiss N, Zhang Y, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J, (2001). Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22): 12503–12508.
166. Wildman H, (2003). The rise and fall of natural products screening for drug discovery. *Fungal Diversity* 13: 231–241.
167. Wilson M y Rudel L, (1994). Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 35(6): 943–955.
168. Yanni A, (2004). The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals*, 38(3): 246–256.
169. Yarishkin O, Ryu H, Park J, Yang M, Hong S, Park K, (2008). Sulfonate chalcone as new class voltage-dependent K⁺ channel blocker. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(1): 137–140.
170. Yen C, Stone S, Koliwad S, Harris C, Farese R, (2008). DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 49(11): 2283–2301.
171. Youdim K, McDonald J, Kalt W, Joseph J, (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(5): 282–288.
172. Yunoki K, Nakamura K, Miyoshi T, Enko K, Kohno K, Morita H, Kusano K, Ito H, (2011). Ezetimibe improves postprandial hyperlipemia and its induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*, 217(2): 486–491.
173. Zampini I, Vattuone M, Isla M, (2005). Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3): 450–456.

174. Zampini I, Villarini M, Moretti M, Dominici L, Isla M, (2008). Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(2), 330–335.
175. Zampini I, Villena J, Salva S, Herrera M, Isla M, Alvarez S, (2012). Potentiality of standardized extract and isolated flavonoids from *Zuccagnia punctata* for the treatment of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae*: in vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2): 287–292.
176. Zhang Z, James A, Huang Y, Ho W, Sahota D, Chen Z, (2005). Quantification and characterization of aortic cholesterol in rabbits fed a high-cholesterol diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(5): 359–366.
177. Zhao L, Jin H, Sun L, Piao H, Quan Z, (2005). Synthesis and evaluation of antiplatelet activity of trihydroxy chalcone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15: 5027–5029.
178. Zhao Y, Vanhoutte P, Leung S, (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2): 83–94.
179. Zodda D, Giammona R, Schifilliti S, (2018). Treatment strategy for dyslipidemia in cardiovascular disease prevention: focus on old and new drugs. *Pharmacy*, 6(1): 10.