

EFECTO DE LA INFUSIÓN DE CÁSCARA DE PIÑONES DE ARAUCARIA ARAUCANA SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN GLÁNDULA SUBMANDIBULAR DE RATAS WISTAR TRATADAS CON 5-FLUOROURACILO Y LEUCOVORINA CÁLCICA

Gallia, María C.^{1,2}; Rivoira, María A.^{4,5}; Bachmeier, Evelin⁴; Bongiovanni, Guillermina A.^{1,3}; Mazzeo, Marcelo A.⁴; Ferrari, Ana^{1,2}.

¹ Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas – PROBIEN (CONICET-UNCo). Neuquén, Argentina.

² Facultad de Ciencias Médicas, UNCo. Cipolletti, Río Negro, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo. Cinco Saltos, Río Negro, Argentina.

⁴ Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UNCo. Córdoba, Argentina.

⁵ Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, UNCo. INICSA-CONICET. Córdoba, Argentina.

celeste.gallia@probien.gov.ar

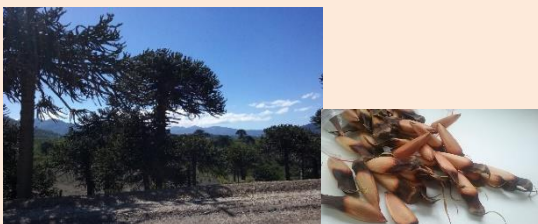


INTRODUCCIÓN

La quimioterapia convencional se asocia con varios efectos tóxicos, incluyendo aquellos que afectan el sistema estomatognático, lo que disminuye la calidad de vida del paciente. Entre las complicaciones orales más comunes se encuentran la mucositis, la inflamación, el sangrado gingival y la hiposalivación. Los agentes anticancerosos aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que genera un daño oxidativo considerable en los tejidos. El citostático 5-fluorouracilo (5-FU) y su biomodulador, la leucovorina cálcica (LV), son ampliamente utilizados en el tratamiento de tumores sólidos, y ambos generan un aumento en el nivel de ROS y el consecuente daño oxidativo celular, similar al efecto de otras drogas citotóxicas. Se ha demostrado que los antioxidantes presentes en la dieta pueden ofrecer protección contra las lesiones oxidativas inducidas por éstos y otros fármacos oncológicos. En particular, estudios previos han mostrado que la ingesta del extracto obtenido de las cáscaras de *Araucaria araucana* incrementa significativamente las defensas antioxidantes en las glándulas salivales de ratas tratadas con la droga oncológica ciclofosfamida (Gallia et al. 2020). El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de los antioxidantes derivados de una planta nativa para revertir los parámetros oxidativos en las glándulas salivares submandibulares de ratas tratadas con 5-FU+LV.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Preparación del extracto antioxidante: Los extractos fueron obtenidos a partir de 2 g de cáscara de piñones de *A. araucana* provistas por la Empresa Nous de Villa Pehuenia (Neuquén, Argentina), obtenidas como un residuo de la industrialización de estas semillas para elaborar productos alimenticios. Se obtuvieron infusiones elaboradas a partir de 2 g de material vegetal molido y 100 ml de agua a 100°C. Luego, las infusiones fueron filtradas y enfriadas a temperatura ambiente. Las infusiones fueron elaboradas diariamente para su consumo fresco.



Ensayos in vivo: El ensayo fue realizado en el bioterio de la Fac. de Odontología de la UNC. El cuidado y uso adecuado de los animales se efectuaron siguiendo el protocolo internacional para cuidado y tratamiento de animales (NIH) y aprobado por el Comité de Bioética de la Fac. Cs. Méd. de la UNC.

Se utilizaron 24 ratas Wistar macho adultos de 400 g de peso corporal, de tres meses de edad distribuidas en cuatro grupos experimentales:

- 1) Grupo control:** sin droga, con agua, sin infusión de extracto antioxidante, y alimentación *ad libitum* (n=6).
 - 2) Grupo tratado con 5-FU+LV** (20 y 10 mg/Kg de peso corporal, respectivamente) durante 5 días, con agua, sin infusión de extracto antioxidante y alimentación *ad libitum* (n=6).
 - 3) Grupo suplementado durante 9 días con la infusión y tratado a partir del día 5 con 5-FU+LV** (20 y 10 mg/Kg de peso corporal, respectivamente) durante 5 días, y alimentación *ad libitum* (n=6) (5-FU+LV+CP).
 - 4) Grupo suplementado durante 9 días con la infusión y alimentación *ad libitum*** (n=6) (CP).
- Al finalizar el tratamiento, los animales fueron ayunados 12 h y anestesiados, extirpándose ambas glándulas submandibulares (GSM).



Durante el ensayo se evaluó la condición corporal de cada grupo experimental, y al finalizar el ensayo se determinó el peso corporal y el de las GSM.

Se realizaron homogenizados de cada GSM en buffer fosfato salino con homogeneizador. Se centrifugaron a 3000 xg a 4°C y los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su uso. Se determinaron parámetros de estrés oxidativo mediante técnicas espectrofotométricas: actividad enzimática de catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD); niveles de ácido úrico (AU) y de malondialdehído (MDA); y actividad antioxidante total (por método FRAP) en los sobrenadantes (Ferrari et al. 2009).

RESULTADOS

Condición corporal

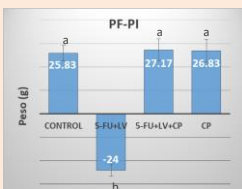


Figura 1: Diferencia de peso corporal final e inicial de las ratas de cada tratamiento (g).



Figura 2: Peso de las glándulas submandibulares de las ratas de cada tratamiento (g).

Biomarcadores de estrés oxidativo

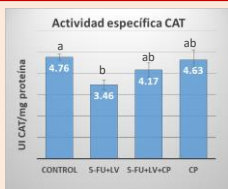


Figura 4: Actividad específica de catalasa de GSM de las ratas de cada tratamiento, expresada como U/mg de proteína.



Figura 5: Actividad específica de GST de GSM de ratas de cada tratamiento, expresada como mU/mg de proteína.

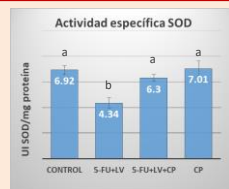


Figura 6: Actividad específica de SOD de GSM de ratas de cada tratamiento, expresada como U/mg de proteína.



Figura 3: A) Fotografía de rata en el día 5 con tratamiento 5-FU+LV. B) Fotografía de rata en el día 5 con tratamiento 5-FU+LV+CP. C) Fotografía de falanges de extremidad superior con lesiones en el tratamiento 5-FU+LV.

- En el grupo tratado con 5-FU+LV se observó un decaimiento general del estado clínico de los animales, con respecto a los demás tratamientos.
- Se observaron cambios en la coloración de pelo y piloerecton (Fig. 3A) con respecto a 5-FU+LV+CP (Fig. 3B).
- Además, falanges con hemorragias y onicolisis (Fig. 3C).



Figura 7: Contenido de ácido úrico en GSM de ratas por tratamiento, expresado como mg AU/mg de proteína.

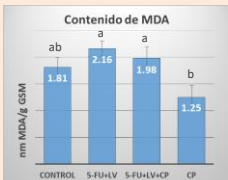


Figura 8: Contenido de MDA por GSM de ratas de cada tratamiento, expresado como nm MDA/g GSM.



Figura 9: Poder antioxidante total de GSM de ratas de cada tratamiento, expresado como µg Equivalentes de Ácido Ascórbico/mg de proteína.

CONCLUSIONES

- Los resultados indican un efecto tóxico del tratamiento oncológico utilizado, observado en la condición general de las ratas y en los efectos sobre parámetros de estrés oxidativo en las GSM.
- El único grupo que mostró disminución significativa en el peso fue el tratado con 5-FU+LV. El grupo tratado con la infusión de cáscara de piñón revierte el efecto del fármaco, mostrando valores de peso semejantes al control.
- El aumento de GST en GSM con 5-FU+LV sería una respuesta adaptativa que favorecería la detoxificación de los fármacos; sin embargo, la caída de las actividades enzimáticas de SOD y CAT y del nivel de AU implican una disminución relevante en la respuesta antioxidante.
- El incremento de los niveles de MDA, un producto final de la lipoperoxidación y marcador de daño oxidativo, en el tratamiento 5-FU+LV, evidencia el estrés oxidativo inducido por este tratamiento oncológico.
- Se verifica el efecto protector de la infusión que revierte los efectos de los fármacos sobre las enzimas antioxidantes CAT, GST y SOD y el compuesto antioxidante AU.

BIBLIOGRAFÍA

- Bachmeier E., Mazzeo M.A., Lopez M.M., Linares J.A., Jarchum G., Wietz F.M., Finkelberg A.B. (2014) Mucositis and salivary antioxidants in patients undergoing bone marrow transplantation (BMT). Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.
- Ferrari A, Lascano CI, Anguiano OL, Pechen de D'Angelo AM, Venturino A (2009) Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. Aquat Toxicol 93:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.03.003>
- Gallia MC, Bachmeier E, Ferrari A, Queralt I, Mazzeo MA, Bongiovanni GA. Pehuenia (*Araucaria araucana*) seed residues are a valuable source of natural antioxidants with nutraceutical, chemoprotective and metal corrosion-inhibiting properties. Bioorg Chem. 2020 Nov;104:104175. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104175>. Epub 2020 Aug 29. PMID: 32920353.
- Mazzeo MA, Linares JA, López MM, Gallaró RV, Bachmeier E, Wietz FM, Finkelberg AB. Functional impairment in submandibular gland of rats induced by 5-fluorouracil and calcium leucovorin. Acta Odontol Latinoam. 2012;25(3):262-8. PMID: 23798072.
- Mazzeo M A; Bachmeier E; López M M; Linares J A; Samar M E; Finkelberg A B; Fonseca I. (2017) Cambios histológicos en Glándula Submandibular de ratas tratadas con ciclofosfamida y vitaminas antioxidantes. Revista de la Facultad de Odontología, UNC. 27 (1).