

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Área Física - Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR)

Grupo de Física Biomédica - Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR)

Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas

“Actividad hemorreológica de fitoquímicos comerciales presentes en plantas medicinales utilizadas popularmente en la Argentina para el tratamiento de la Diabetes”

Autor: Farm. Patricia Buszniez

Directora: Dra. Bibiana D. Riquelme

Codirectora: Dra. Mabel D'Arrigo

Año 2024

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de *Doctor en Ciencias Biomédicas* de la Universidad de Rosario, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el *Área Física del Departamento de Química-Física*, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) y en el *Grupo de Física Biomédica* del IFIR (CONICET – UNR), durante el período comprendido entre el *2 de junio de 2016 y el 31 de Mayo de 2024*, bajo la dirección de la *Dra. Bibiana D. Riquelme* y la codirección de la *Dra. Mabel D'Arrigo*.

Agradecimientos

A mi directora, Dra. Bibiana Riquelme, y mi codirectora, Dra. Mabel D'Arrigo, les agradezco profundamente por la enseñanza, orientación y paciencia que hicieron de este camino una experiencia de formación personal única y avance profesional. Además, les agradezco por la amistad, y el apoyo en todos los momentos compartidos.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario junto a todos los integrantes del Doctorado en Ciencias Biomédicas que me han recibido y brindado la oportunidad de cultivar mis conocimientos y crecer en mi profesión.

A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, en especial al Área de Física, y al Grupo de Física Biomédica del IFIR (CONICET-UNR), y a los compañeros de laboratorio donde se ha desarrollado esta tesis: Hermano, Martín y Marcus.

A todos los compañeros de viaje: doctorandos, colegas, pasantes y amigos con quienes compartimos gratos momentos cotidianos en el trabajo de investigación, y en especial a la Dra. Analía I. Alet y al Dr. Horacio V. Castellini por sus valiosos aportes a mi Tesis Doctoral.

A mi familia, y en especial a mis hijos, por estar a mi lado, y aunque a veces lejos me llenan el corazón de vida, amor y alegría.

A todos muchas gracias.

*“Estoy entre aquellos que piensan que
la ciencia tiene una gran belleza...”*

Marie Curie

Índice

Agradecimientos	3
Difusión realizada de los resultados de la tesis	8
Artículos completos publicados	8
Presentaciones a Congresos con resúmenes publicados	9
Abreviaturas y símbolos	12
Lenguaje	12
1- Resumen	13
2 –Introducción	15
2.1 – Plantas medicinales y diabetes	15
2.2 Hemorreología	16
2.2.1 Conceptos y definiciones	17
2.2.2 Características de los eritrocitos humanos	18
Características morfológicas de los eritrocitos humanos	18
Estructura de los eritrocitos humanos	19
Glicocalix:	20
Bicapa lipídica:	20
Comportamiento reológico del eritrocito	21
Influencia de los eritrocitos en el comportamiento reológico de la sangre	21
2.2.3 Agregación eritrocitaria	22
2.2.4 Alteraciones hemorreológicas en la diabetes	23
2.3 Modelización <i>in vitro</i> de la glicación eritrocitaria por hiperglucemia	24
2.4 Fitoquímicos seleccionados para su evaluación	25
2.4.1 Trigonelina (T)	27
2.4.2 Quercetina (Q)	28
2.4.3 β -sitosterol (BS)	30
Hipótesis	33
Objetivo general	33
Objetivo específico	33

3 – Desarrollo	34
3.1- Materiales y métodos	34
3.1.1 Material biológico y preparación de muestras	34
Muestras de glóbulos rojos humanos	34
Glicación <i>in vitro</i> de glóbulos rojos	35
Fitoquímicos estudiados	35
Tratamiento de los GR con los fitoquímicos	36
3.1.2 Viscoelasticidad eritrocitaria	36
3.1.3 Cinética de agregación eritrocitaria	39
3.1.4 Análisis digital de imágenes	41
Parámetros de agregación eritrocitaria	42
Coeficiente de células aisladas (C_{CA})	42
Recuento y clasificación de los agregados	42
Parámetros de forma de los agregados (ASP)	42
Morfología de los eritrocitos	43
3.1.5 Parámetros bioquímicos y hematológicos	44
Parámetros hematológicos	44
Parámetros bioquímicos	44
3.1.6 Análisis estadístico	45
3.2 Resultados	46
3.2.1 Glicación <i>in vitro</i> de los glóbulos rojos	46
Análisis digital de imágenes	46
Viscoelasticidad eritrocitaria	47
Cinética de agregación eritrocitaria	49
Niveles de glucosa en el medio de suspensión durante la incubación	50
Condiciones óptimas para el proceso de glicación <i>in vitro</i> de GR	53
3.2.2 Trigonelina	53
Evaluación de la hemocompatibilidad de trigonelina para la optimización de la incubación	53
Evaluación de la actividad de trigonelina en los glóbulos rojos glicosados	55
Análisis digital de imágenes	56
Viscoelasticidad eritrocitaria	58

Cinética de Agregación eritrocitaria	59
3.2.3 Quercetina	60
Análisis digital de imágenes	61
Viscoelasticidad eritrocitaria	68
Cinética de agregación eritrocitaria	70
3.2.4 β -sitosterol	71
Estudios preliminares con el fitoterápico β -sitosterol	71
Soluciones de BS utilizadas en los ensayos preliminares	71
Análisis digital de imágenes	72
Selección de las concentraciones y medios de disolución para le BS	73
Parámetros viscoelásticos de la membrana eritrocitaria	74
Cinética de agregación eritrocitaria	75
Parámetros de agregación eritrocitaria por Análisis Digital de Imágenes	75
4 – Discusión de los resultados y Conclusiones	78
4.1 Discusión y conclusiones particulares	78
4.1.1 Sobre el método de glicación <i>in vitro</i>	78
4.1.2 Sobre el fitoquímico trigonelina	80
4.1.2 Sobre el fitoquímico quercetina	82
4.1.3 Sobre el fitoquímico β -sitosterol:	84
4.2 Conclusiones generales	85
4.3 Perspectivas futuras	85
Apéndices	87
Apéndice A: Protocolos para la preparación de los medios de suspensión y de incubación	87
A-1 Solución PBS	87
A-2 Solución PVP	87
A-3 Soluciones de glucosa	87
A-4 Soluciones de Trigonelina	87
A-5 Soluciones de Quercetina	88
A-6 Solución de β -sitosterol	88

Apéndice B: Protocolo obtención de GR, lavado e incubaciones	89
B-1 Obtención de la muestra de sangre	89
B-2 Lavado de GR	89
B-3 Determinación de la concentración de glucosa	89
B-4 Glicación <i>in vitro</i> de GR	90
B-5 Incubación de GRg con soluciones de Trigonelina	91
B-6 Incubación de GRg con soluciones de Quercetina	91
B-7 Incubación de GRg con soluciones de β -sitosterol	92
Apéndice C: Técnicas de análisis de la agregación y viscoelasticidad eritrocitaria	94
C-1 Adquisición de imágenes digitales microscópicas	94
C-2 Determinación de los parámetros de viscoelasticidad eritrocitaria	94
C-3 Obtención de los parámetros de cinética de agregación eritrocitaria	94
Apéndice D: Modelo de consentimiento informado y dictamen.	95
Bibliografía	97

Difusión realizada de los resultados de la tesis

Artículos completos publicados

- Mascaro Grosso H., **Buszniez P.**, Riquelme B. D. Hemocompatibility and hemorheological activity of aqueous extracts from *Phyllanthus sellowianus*: Effects on in vitro glycated erythrocytes. *Journal of Herbal Medicine*, **2024**, 100945, ISSN 2210-8033, <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2024.100945>
- **Buszniez P.**, Gómez M., Castellini H. V., Riquelme B. D. Diseño de interfaz en lenguaje python para el análisis de microfotografías: aplicación a la evaluación de la actividad hemorreológica de quercetina. *Anales AFA Vol. 2*, **2024**. En prensa.
- Mascaro Grosso, H; **Buszniez, P**; Riquelme, B.D. Hemocompatibility and Hemorheological Activity of Aqueous Extracts from *Phyllanthus Sellowianus*. Effects on *in Vitro* Glycated Erythrocytes. **2023**. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4645944> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4645944>
- Mascaro Grosso, H; **Buszniez, P**; Castellini H.V; Riquelme, B. Efecto de extractos acuosos de *Phyllanthus sellowianus* sobre las propiedades viscoelásticas de glóbulos rojos humanos: actividad antidiabética. *Anales AFA (ISSN: 1850-1168)*, **2023**. <https://anales.fisica.org.ar/index.php/analesafa/article/view/2385/2905>
- Riquelme, B; Mascaro Grosso, H; Toderi, M; **Buszniez, P.**; D'Arrigo M. (2019) *In vitro* effect of trigonelline on the erythrocyte aggregation in a model of diabetes. *Anais do Encontro Anual da Biofísica* **2019**. São Paulo: Blucher, p. 77-78, DOI: [10.5151/biofisica2019-22](https://doi.org/10.5151/biofisica2019-22).
- Mascaro Grosso, H; **Buszniez, P**; Estrada, E; Riquelme B. (2017) Estudio comparativo de los parámetros reológicos, ópticos y fisicoquímicos de extractos acuosos de hojas de *Bauhinia forficata*. *Ars Pharmaceutica*, 58(2): 1 - 3. DOI: [10.4321/S2340-98942017000200006](https://doi.org/10.4321/S2340-98942017000200006)
- **Buszniez, P**; Mascaro Grosso, H; Di Sapia, O; Riquelme B. (2017) Caracterización fisicoquímica, óptica y reológica de soluciones extractivas de *Phyllanthus sellowianus* y *Bauhinia forficata*. *ANALES AFA*, 28(2): 66 - 69. DOI: <http://dx.doi.org/10.31527/analesafa.2017.28.2.66>

Presentaciones a Congresos con resúmenes publicados

- **Buszniez, P;** Gómez, M; Castellini, H; Riquelme, B.D. estudio del efecto de **quercetina** en la agregación eritrocitaria por análisis digital de imágenes automatizado. ePoster SBR **2023**, Rosario. <https://drive.google.com/drive/folders/1DWOCLMsguDyKksbOzipGV3SUSKYCdV-Q?usp=sharing>
- Mancilla Canales, M; Mascaro Grosso, H; **Buszniez, P;** Riquelme, B. Uso del cuantificador falsos vecinos próximos para el estudio de la actividad hemorreológica de extractos acuosos de *Bauhinia forficata*. ePoster SBR **2023**, Rosario. <https://drive.google.com/drive/folders/1DWOCLMsguDyKksbOzipGV3SUSKYCdV-Q?usp=sharing>
- Mascaro Grosso, H; **Buszniez P;** Castellini, H; Riquelme, B. Estudio comparativo del efecto in vitro de extractos acuosos de *Bauhinia forficata* y *Phyllanthus sellowianus* en glóbulos rojos humanos. eposter SBR **2023**, Rosario. <https://drive.google.com/drive/folders/1dwoclmsgudykksbozipgv3suskycdv-q?usp=sharing>
- Mascaro Grosso, Hermano; **Buszniez, Patricia;** Castellini, Horacio; Riquelme Bibiana Doris. Efecto de extractos acuosos de *Phyllanthus sellowianus* sobre las propiedades viscoelásticas de glóbulos rojos humanos. Actividad antidiabética. Argentina. Bariloche. **2022**. Libro. Resumen. Congreso. 107a Reunión de la Asociación Física Argentina. AFA.
- **Buszniez, Patricia;** Fassi, Francisco; Batista Da Silva, Marcus V.; Castellini, Horacio; Riquelme, Bibiana D. Hemorheological effect of beta-sitosterol in a model of in vitro hyperglycemia. XXXVth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (ISLH), Bologna, Italia, 8 al 10 de setiembre de **2022**. Publicado en IJLH (ISSN 1751-5521) pagina 3 John Wiley & Sons Ltd <https://doi.org/10.1111/ijlh.14006>
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ijlh.14006>
- Gomez Fava, Florencia; **Buszniez, Patricia;** Castellini, H.; Riquelme Bibiana Doris. Diseño de interfaz en lenguaje Python para el procesamiento de microfotografías: aplicación a la evaluación de la actividad hemorreológica de fitoquímicos. Argentina. Bariloche. **2022**. Libro. Resumen. Congreso. 107^a Reunión de la Asociación Física Argentina.

- Mancilla Canales M, **Buszniez P**, Mascaro Grosso H, Riquelme BD, Korol A. Estudio preliminar del comportamiento dinámico no lineal de poblaciones eritrocitarias glicadas e incubadas con β -sitosterols. SBR **2022** – Publicado en inglés: Preliminary study of non-linear dynamic behaviour of red blood cells glicated and incubated with β -sitosterol Biocell 2023.
- **Buszniez, Patricia**; Fassi, Francisco; Batista Da Silva, Marcus, Castellini, Horacio; Riquelme, Bibiana. Efecto hemorreológico de β -sitosterol en un modelo de hiperglucemia in vitro. XLI Annual Meeting SBR 23 y 24 de noviembre de **2021**. Publicado en inglés: Hemorheological effect of β -sitosterol in a model of in vitro hyperglycemia. BIOCELL Vol. 46, Suppl. 3, ABSTRACTS A11, 2022 (ISSN 0327-9545, e ISSN 1667-5746). <https://acrobat.adobe.com/link/review?uri=urn:aaid:scds:US:a8b397ba-9022-3bc1-a850-6d10135234fa> DOI:10.32604/biocell.2022.016892
- Mascaro Grosso, H.; Riquelme, B.; **Buszniez, P**. Alteraciones de los parámetros viscoelásticos de glóbulos rojos glicados y tratados con infusión de hojas y corteza de *Phyllanthus sellowianus*. Argentina. Rosario. **2020**. Resumen. Congreso. XXII Congreso y XL Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario 2020. Sociedad de Biología de Rosario. Libro de Resúmenes (ISSN 2314-1484). <https://www.sbr.org.ar/site/images/pdf/libro-de-resumenes-sbr-2020.pdf>
- **Buszniez, P**; Toderi, M; Mascaro Grosso, H; D'Arrigo, M; Riquelme. Efecto de **Quercetina** sobre las propiedades mecánicas del glóbulo rojo humano. 104^a Reunión de la Asociación Física Argentina, Santa Fe, **2019**. <https://www.fisica.org.ar/actividades/rafas/libros-de-resumenes/>.
- **Buszniez, P**; Toderi, M; Mascaro Grosso, H; D'Arrigo, M; Riquelme. Estudio Preliminar de la actividad hemorreológica de la quercetina. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual SBR, Rosario, **2019**. Libro de Resúmenes (ISSN 2314-1484). <https://www.sbr.org.ar/Site/images/PDF/Libroderesumenes2019-vf.pdf>.
- Mascaro Grosso H, **Buszniez P**, D'Arrigo M, Toderi, M, Riquelme B. Análisis de la actividad Hemorreológica de las maceraciones de *B. forficata* y de *P. sellowianus*. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual SBR, Rosario, **2019**. Libro de Resúmenes (ISSN 2314-1484). <https://www.sbr.org.ar/Site/images/PDF/Libroderesumenes2019-vf.pdf>
- **Buszniez P**, Mascaro Grosso H, Castellini H, D'Arrigo M, Riquelme B. Relationship

between glucose consumption and alteration in erythrocyte aggregation in a non-enzymatic glycosylation model in vitro. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual SBR **2018**. 27/11/2018. Biocell (ISSN 1667-5746).

- **Buszniez, P;** Mascaro Grosso, H; Pusillico, R; D'Arrigo, M; Riquelme, B. Relación entre el consumo de glucosa y la alteración en la agregación eritrocitaria en un modelo de glucosilación no enzimática in vitro. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 27 y 28 de noviembre de **2018**. Libro de Resúmenes (ISSN 2314-1484).
- **Buszniez, P;** Toderi, M; Mascaro Grosso, H; D'Arrigo, M; Riquelme, B. Estudio del efecto de **Trigonelina** sobre la agregación eritrocitaria en un modelo de diabetes in vitro por análisis digital de imágenes. 103^a Reunión de la Asociación Física Argentina, Buenos Aires, **2018**. <https://www.fisica.org.ar/actividades/rafas/libros-de-resumenes/>.

Abreviaturas y símbolos

δ - Desfasaje entre la tensión de corte oscilatoria y la deformación de los eritrocitos

η_m - Viscosidad superficial de la membrana eritrocitaria

μ - Módulo elástico de la membrana eritrocitaria

Amp - La amplitud de la intensidad luminosa

ATP - Trifosfato de adenosina

CA - Células aisladas

CCA - Coeficiente de células aisladas

IA – Índice de agregación eritrocitaria

GR - Glóbulos rojos

GRg - Glóbulos rojos glicosados

T - trigonelina

Q - quercetina

BS - β -sitosterol

GLUT1 – Transportador de glucosa 1

G' - Módulo de almacenamiento

G'' - Pérdida dinámica

IA - Índice de agregación eritrocitaria

ID - Índice de deformabilidad eritrocitaria

ND: No determinado

PBS - Buffer fosfato salino

pH - Coeficiente que indica el grado de acidez

PVP - Polivinilpirrolidona

$t_{1/2}$ – El tiempo transcurrido para la mitad de la agregación total

Lenguaje

Cluster: agregado anómalo de eritrocitos en forma globular

Rouleaux: agrupamiento eritrocitario en forma de pilas de monedas

on-click: indica hacer “clic” o encendido

1- Resumen

Introducción: La diabetes mellitus tipo 2 (DBT2) se presenta como un síndrome metabólico, dando como resultado la consecuente hiperglucemia. Debido a esto, los eritrocitos son modificados químicamente por efecto de la glicación, produciendo una disminución de la carga eléctrica superficial negativa, reduciendo la repulsión electrostática que favorece la agregación eritrocitaria y altera los parámetros hemorreológicos. Existe una amplia variedad de opciones terapéuticas y en las últimas décadas se han estudiado una gran cantidad de plantas medicinales utilizadas popularmente para el tratamiento de la DBT2. Es importante establecer la relación existente entre los componentes fitoquímicos y su mecanismo de acción.

Objetivo: Estudiar la posible actividad hemorreológica de tres fitoquímicos comerciales (**trigonelina**, **quercetina** y **β -sitosterol**) presentes en plantas autóctonas utilizadas popularmente para el tratamiento de la diabetes, como lo son *Bauhinia forficata* (Pezuña de vaca) y *Phyllanthus sellowianus* (Sarandí blanco).

Materiales y métodos: Para cada fitoquímico a ensayar se utilizaron como unidades de análisis 10 muestras de sangre obtenidas de donadores sanos, previo consentimiento informado y aprobación del Comité de Ética del Hospital Centenario de Rosario (Dictamen 551, 12/2015). Luego, los eritrocitos fueron separados y tratados *in vitro* de acuerdo a los respectivos protocolos ya estandarizados obteniendo primeramente los eritrocitos glicados (**GRg**), de acuerdo al modelo de glicación *in vitro* propuesto. Posteriormente, los **GRg** se incubaron con soluciones de los tres fitoquímicos seleccionados. Con el Reómetro Eritrocitario se evaluaron las alteraciones en la viscoelasticidad eritrocitaria en régimen estacionario y dinámico. La determinación de los parámetros de cinética de agregación eritrocitaria se realizó utilizando el agregómetro eritrocitario de chip óptico. Se obtuvieron imágenes digitales microscópicas de las muestras y se realizó su análisis para la obtención de parámetros de morfología y tamaño de agregados con software *ISCapture*, Image J y Python. Los resultados fueron graficados y analizados estadísticamente mediante el programa Prism6, con tests Anova y Tukey.

Resultados: Etapa preliminar: la concentración de glucosa de 0,4 g/dL resultó ser la óptima para la modelización de la glicación *in vitro* con un tiempo máximo de incubación de 3 h. Las concentraciones óptimas de las soluciones de los fitoquímicos para la

incubación de los eritrocitos resultaron ser: para **trigonelina** menor a 1 mg/mL, para **quercetina** de 10 y 100 μ M y para **β -sitosterol** de 40 μ M.

El análisis de los parámetros viscoelásticos y de agregación muestra alteraciones significativas de los **GRg** como las observadas en pacientes diabéticos, que revierten al ser tratados con las soluciones de los tres fitoquímicos ensayados.

Conclusiones: El efecto sobre los eritrocitos producido por las soluciones de **trigonelina**, **quercetina** y **β -sitosterol** indicarían la hemocompatibilidad de estos compuestos a las concentraciones ensayadas. Además, muestran una interacción de estos fitoquímicos con la bicapa lipídica y el glicocalix de la membrana eritrocitaria. La modificación de los parámetros de agregación eritrocitaria sugiere una actividad antiagregante de los tres compuestos, con la consecuente reversión del aumento de la agregación producido por la glicación in vitro. Esto sugiere su posible uso como coadyuvante para el tratamiento de las complicaciones de la diabetes y otras patologías vasculares.

2 –Introducción

2.1 – Plantas medicinales y diabetes

La diabetes tipo 2 (DBT2) es una afección crónica que ha estado en aumento en los últimos años. Esto se debe al cambio en las costumbres, hábitos y conductas dietéticas, con el consecuente aumento del sobrepeso y la obesidad. En la actualidad, alrededor de 463 millones de adultos de entre 20 y 79 años tienen diabetes. Esto representa el 9.3% de la población mundial en este grupo de edad. Se prevé que la cantidad total aumente para el año 2045 a 578 millones (10.2%), y para el año 2030 a 700 millones (10.9%) (Ruso M et al., 2023).

En las últimas décadas se han estudiado en todo el mundo una gran cantidad de plantas medicinales utilizadas popularmente para el tratamiento de la diabetes (Chang C et al., 2013). Actualmente alrededor de 1200 especies vegetales han sido reconocidas por su actividad antidiabética, incluyendo un gran número de familias (Leguminosae, Cucurbitaceae, Araliaceae, Liliaceae, Solanaceae, Compositae, Campanulaceae, Myrtaceae y otras). Hasta el momento, sólo un tercio de ellas fueron estudiadas, analizadas y documentadas en alrededor de 460 publicaciones (Qi LW et al., 2010).

En una amplia compilación publicada sobre productos naturales utilizados para el tratamiento de la DBT2 y sus comorbilidades se mencionan principios de origen vegetal, como galegina (aislada de *Galega officinalis*) que es de gran similitud con la droga antidiabética actualmente utilizada metformina, también picnogenol, palmatina, berberina, **trigonelina**, ácidos gimnemicos, y otros (Ríos J et al., 2015). Todos ellos incluyen los grupos químicos de interés en nuestro análisis: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, alcaloides y saponinas triterpénicas.

En nuestro país son tradicionalmente utilizadas varias especies vegetales autóctonas. En particular, el *Phyllanthus sellowianus* Müll Arg. (familia Phyllanthaceae) ha sido incluido en la Farmacopea Argentina, debido a sus propiedades antidiabéticas descritas por Hnatyszyn et al. en 1997 y 1999 con estudios *in vitro* e *in vivo*. Otras plantas medicinales conocidas popularmente son por ejemplo la Pezuña de Vaca (*Bauhinia forficata*) y el Yacón (*Smallanthus sonchifolius*). Entre los compuestos aislados de estas especies, principalmente se encuentran saponinas, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, terpenos, cumarinas, ácidos fenólicos y polisacáridos (Dueñas Rivadeneiras A et al., 2014).

Sin embargo, aunque se han abordado importantes investigaciones sobre la caracterización química de sus componentes y la actividad biológica, farmacológica o toxicológica de diferentes extractos vegetales, es de gran importancia profundizar los estudios a fin de establecer la relación existente entre los componentes fitoquímicos y su acción terapéutica específica. Además, dichas investigaciones se vuelven una tarea necesaria para el desarrollo de nuevas y mejores drogas.

Los procedimientos por los cuales los principios activos desencadenan sus acciones farmacológicas son variados y complejos, y en ocasiones todavía desconocidos. Según su interacción, éstos se clasifican en *específicos* si desarrollan su actividad farmacológica en base a una interacción estructural con un receptor concreto (principalmente de naturaleza proteica) o *inespecíficos* cuando su actividad se desarrolla por alteración estructural o funcional de las células donde actúan, como los cambios producidos en la presión osmótica, la permeabilidad de las membranas, las reacciones de oxidación, etc. (Kuklinski C et al., 2016).

Dentro de las diferentes actividades investigadas sobre la capacidad de modular la glucosa se pueden mencionar aquellas relacionadas con mecanismos que regulan su reabsorción, la resistencia a la insulina, la función de las células β del islote pancreático, y la homeostasis péptido tipo Glucagón 1, entre otras (Sakthivel K et al., 2012).

Otros de los mecanismos, en los cuales los productos naturales nombrados están involucrados son: la modificación de los mecanismos mediados por el receptor activado por el proliferador de peroxisomas, la inhibición de la actividad de la proteína tirosina fosfatasa 1B, la modificación de la expresión génica, y las actividades de hormonas implicadas en la homeostasis de la glucosa tales como la adipopectina, resistina e incretina, y la reducción del estrés oxidativo (Mucalo, I et al., 2014; Ríos JL et al., 2016).

Diversos ensayos realizados con productos vegetales, incluyendo ensayos clínicos, han contribuido de manera relevante al conocimiento de los mecanismos de acción por los cuales se alcanzan los efectos terapéuticos estudiados y abren nuevas posibilidades con un alto nivel de credibilidad en el campo de las plantas medicinales (Ríos J et al., 2016; Properzi G et al., 2018; Gutiérrez Hervás M, 2019).

2.2 Hemorreología

En Biomedicina, los estudios hemorreológicos son considerados una útil herramienta para la detección y la cuantificación de alteraciones en diversas patologías, como la diabetes,

la hipertensión arterial y las anemias (Riquelme B et al., 2006). Además, las técnicas hemorreológicas permiten analizar la acción de diversos agentes (medicamentos, anestésicos, biomateriales, parásitos, radiaciones, etc.) (Batista M et al., 2021; Ponce de Leon P et al., 2016, 2020; Riquelme B et al., 2011, 2022), así también como la hemocompatibilidad y funcionalidad de los distintos componentes de los extractos vegetales (Mascaro H et al., 2019, 2023a, 2023b).

2.2.1 Conceptos y definiciones

La *Reología* es una ciencia multidisciplinaria que estudia la respuesta interna de los materiales reales a la acción de tensiones, fuerzas o coacciones exteriores. Literalmente el vocablo *Reología* (del griego *reos*, fluir, y *logos*, estudio) significa el estudio del flujo de los materiales, pero se ha extendido mucho más. En síntesis, es la ciencia vinculada al estudio, en casi todos los aspectos, de las deformaciones de los cuerpos reales bajo la influencia de acciones exteriores, incluyendo desde fenómenos de flujo irreversible hasta los casos de deformación que conducen o no a cambios permanentes en la posición de los elementos que conforman el material (Ferguson J et al., 1991).

La *Reología* fue aplicada en particular, al estudio de los materiales biológicos, lo que dio origen a la *Biorreología*. Entre los materiales biológicos la sangre es un material que presentaba complejidades que extienden el campo de estudio y las posibilidades de investigación. Así nació en la década del '50 la *Hemorreología* o reología sanguínea que es la disciplina que estudia la deformación y el flujo del fluido sanguíneo en general, y de sus componentes, así también como su interacción con los tejidos de los vasos sanguíneos y microcapilares.

La *Hemorreología* caracteriza las propiedades físicas del flujo de sangre, las cuales pueden ser evaluadas en el ser humano a través de la medida de los parámetros hemorreológicos como por ejemplo la viscosidad sanguínea, la viscosidad plasmática, la deformabilidad de los glóbulos rojos y la agregación eritrocitaria. Estos parámetros juegan un rol determinante en el comportamiento fisiopatológico de la circulación sanguínea (Baskurt O et al., 2007). El estudio de las propiedades reológicas de la sangre representa un polo importante de investigación biofísica y clínica de la fisiopatología cardiovascular y tiende a transformarse en un instrumento de diagnóstico preventivo (Delannoy M et al., 2015).

La *Hemorreología Clínica* estudia diferentes aspectos, abarcando la patogénesis y la sintomatología de las vasculopatías, así como también los métodos de diagnóstico para

poder realizar mediciones profilácticas y terapéuticas. Es bien conocida la importancia que plantean los problemas microcirculatorios que se presentan, tanto en pacientes diabéticos como en hipertensos (D'Arrigo M et al., 2002). En las últimas décadas se han realizado diversos estudios sobre las alteraciones hemorreológicas, orientados hacia determinados grupos de riesgo dentro de la población. Entre las alteraciones más importantes que se observaron en estos pacientes, se señala un significativo aumento de la viscosidad de la sangre (hiperviscosidad). El incremento de la viscosidad con respecto a individuos sanos puede deberse tanto a factores plasmáticos (aumento de proteínas séricas, como el fibrinógeno, responsable en mayor parte del incremento en la agregación eritrocitaria) como a factores celulares (reducción en el contenido de ácido siálico en la membrana del glóbulo rojo, etc.) responsables de la hiperagregación eritrocitaria (Ross M. & Pawlina W, 2020).

2.2.2 Características de los eritrocitos humanos

Características morfológicas de los eritrocitos humanos

El eritrocito, hematíe o glóbulo rojo (GR) es un elemento de la sangre que no contiene núcleo. La misión principal del eritrocito es transportar y proteger la hemoglobina, la cual es fundamental para realizar la función respiratoria confiriéndole a la sangre su color rojo característico. El eritrocito contiene en su interior además de la hemoglobina, las enzimas necesarias para su metabolismo celular.

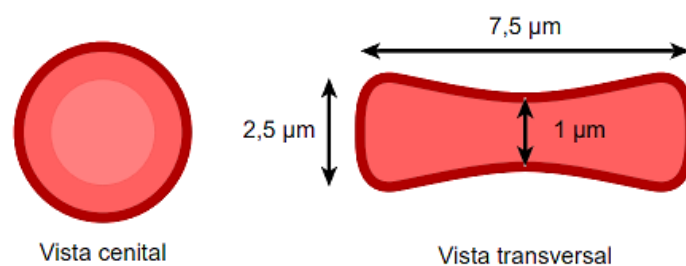


Figura 2.1. Esquema del glóbulo rojo mostrando sus dimensiones y su característica forma bicóncava

El eritrocito es un disco bicóncavo de alrededor de 7,5 µm de diámetro, 2,5 µm de espesor máximo y 1 µm de espesor mínimo (Figura 2.1). Puede describirse como un saco membranoso lo suficientemente robusto como para soportar las turbulencias en la circulación siendo capaz de deformarse para circular por capilares de una micra de

diámetro gracias a que posee una gran superficie en relación a su volumen. Esto favorece además el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el interior del eritrocito y el plasma sanguíneo (Ross M & Pawlina W, 2020).

La forma del eritrocito está influida por fuerzas osmóticas. En la Figura 2.2 se observan las imágenes de eritrocitos en función de la osmolaridad del medio, hipotónico, isotónico o hipertónico. En una solución hipotónica, por el contrario, los eritrocitos aumentan de tamaño debido a la captación de agua y adoptan la forma esférica (Figura 2.2a). En una solución hipertónica los eritrocitos disminuyen de tamaño por la pérdida osmótica de agua y adoptan una forma crenada característica. La célula tiene una menor concentración de solutos que el líquido extracelular circundante, y el agua se difunde fuera de la célula por ósmosis, lo que hace que el citoplasma disminuya su volumen. Como resultado, la célula se encoge y la membrana celular desarrolla muescas anormales. En consecuencia se observan en la célula proyecciones o espículas grandes e irregulares (formando acantocitos) o más pequeñas, numerosas y regulares (formando equinocitos, Figura 2.2c).

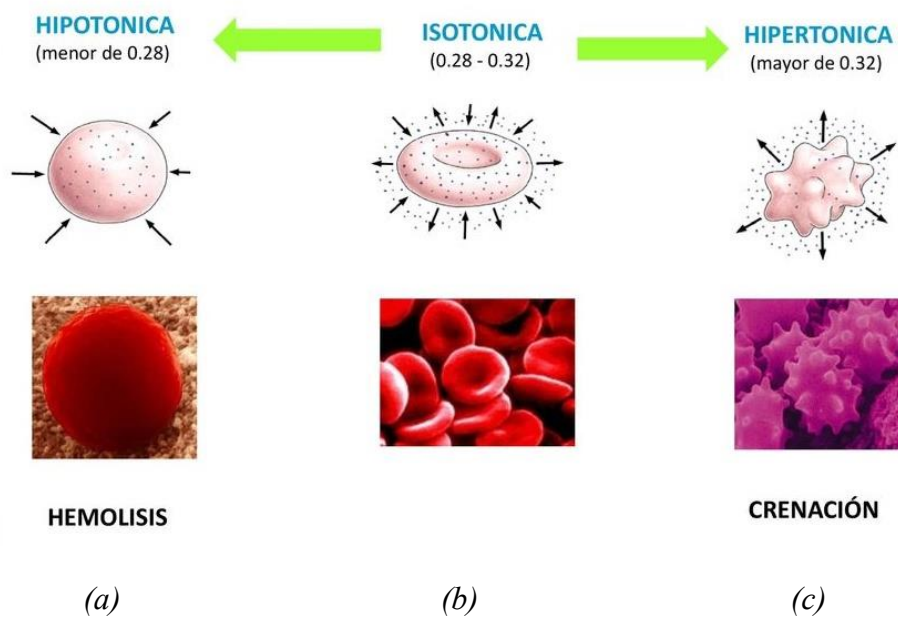


Figura 2.2. Representación esquemática de los eritrocitos en diferentes medios: (a) hipotónica (aumento de volumen o hemólisis); (b) isotónica (normal); (c) hipertónica (crenación o contracción de la membrana celular) (Moya Sáez J, 2016).

Estructura de los eritrocitos humanos

El eritrocito presenta una membrana cuya estructura está formada por capas tal como se representa en la Figura 2.3.

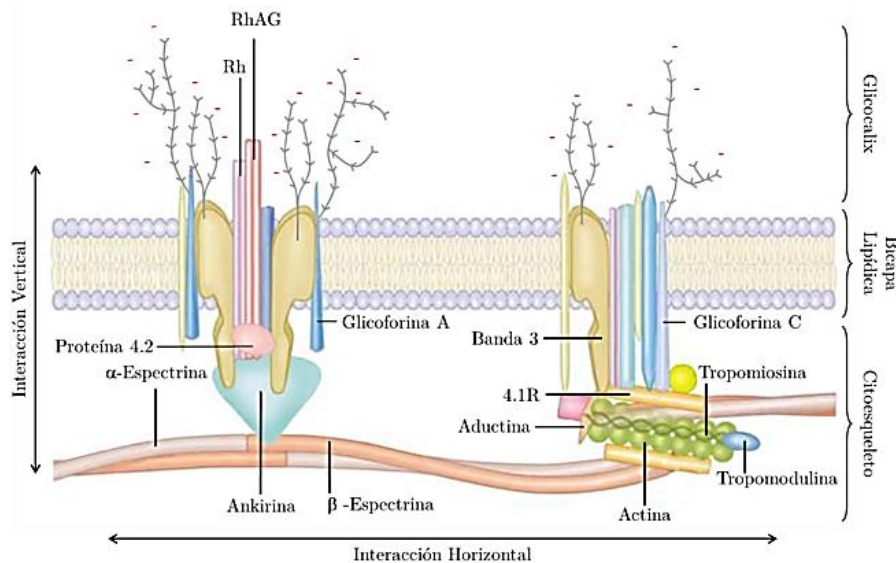


Figura 2.3. Representación esquemática de la membrana del GR donde se presenta interacción de proteínas de forma vertical con la banda 3, Rh, RhAG, 4.2 y anquirina (anclaje del citoesqueleto a la bicapa lipídica) y la interacción de forma horizontal con las espectrina, mediante la aducina y actina (conexión entre las fibras del citoesqueleto) (Mohandas N & Gallagher PG, 2008).

Glicocalix: Es la capa más externa constituida por glicoproteínas periféricas, como por ejemplo las glicoforinas. Estas proteínas contienen cadenas de oligosacáridos que le otorgan la carga eléctrica superficial negativa a los eritrocitos (Murray RK et al., 2010).

Bicapa lipídica: Consiste en dos monocapas lipídicas fluidas compuesta aproximadamente por un 50% de lípidos (principalmente fosfolípidos y colesterol) y otro 50% de proteínas. La bicapa encierra una solución de hemoglobina, la cual constituye alrededor del 95% de las proteínas intracelulares del eritrocito y el 5% restante incluye las enzimas requeridas para la producción de NADH y ATP. Los fosfolípidos más importantes son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina junto con la esfingomielina. Los que contienen colina (fosfatidilcolina y esfingomielina) predominan en la cara externa, y los que contienen amino (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina), en la cara interna. Los lípidos son los responsables de la característica fluida de la membrana.

Citoesqueleto: Es la red o malla de proteínas retractiles asociada a la matriz lipídica por su cara interna. Las principales proteínas de la membrana son la espectrina, anquirina, la proteína de intercambio aniónico, la actina, y la banda 4.1 (Garrote SH, et al., 2012). Las

proteínas del citoesqueleto son las responsables del comportamiento elástico de la membrana eritrocitaria.

Los eritrocitos no poseen organelas intracelulares, por lo tanto, como no hay mitocondrias en el interior de los mismos, no hay producción de ATP mediante fosforilación oxidativa. Sin embargo, son capaces de sintetizar ATP a partir de la glucólisis anaeróbica (Mohandas N et al., 1994; Telen MI et al., 1994).

Comportamiento reológico del eritrocito

El eritrocito con su forma bicóncava, además de facilitar el intercambio de gases (suministrando oxígeno a los tejidos y eliminando dióxido de carbono), le confiere una alta relación superficie/volumen, lo que facilita su deformación. Cuando el eritrocito atraviesa los microcapilares, la deformabilidad cumple un rol principal dado que debe poder atravesar conductos de diámetros de alrededor de 2 μm , es decir mucho menores al suyo. Las proteínas espectrina, anquirina y otras proteínas de membrana periféricas determinan la forma y flexibilidad del eritrocito. Por lo tanto, para que el eritrocito sea fácilmente deformable, y para que la deformación sea reversible, su membrana debe ser tanto fluida como elástica (viscoelástica). La bicapa lipídica es fluida a 37°C, tiene poca estabilidad estructural y se fragmenta con facilidad, mientras que el glicocáliz y el citoesqueleto estabilizan la bicapa, regulando de esta manera el comportamiento viscoelástico (Riquelme B et al., 1999).

Influencia de los eritrocitos en el comportamiento reológico de la sangre

Los glóbulos rojos son, tanto por sus propiedades mecánicas como por su abundancia, los principales determinantes del comportamiento reológico de la sangre entera. La viscosidad de la sangre puede definirse como la resistencia al flujo a consecuencia de una fricción interna; cuanto mayor es la resistencia, mayor será la viscosidad de la sangre. La sangre es un fluido no newtoniano, ya que su viscosidad varía con las condiciones del flujo. Esto se debe a las variaciones que la agregación y la deformabilidad eritrocitaria experimentan con las distintas condiciones de cizallamiento. En particular, se ha demostrado que la sangre posee un comportamiento “pseudoplástico” dado que su viscosidad aumenta a medida que disminuye la velocidad del flujo, lo cual ocurre fundamentalmente cuando disminuye el diámetro capilar y se acerca al de los eritrocitos (Cheng Z et al., 2000).

A bajas velocidades de corte en el flujo sanguíneo, cuando las fuerzas que actúan sobre los glóbulos rojos son pequeñas, se observan los mayores valores de la viscosidad

sanguínea. Por el contrario, a velocidades de corte elevadas, los glóbulos rojos se desagregan y se deforman, cambiando su habitual forma discoidea por una forma hidrodinámica que opone una resistencia mínima al flujo sanguíneo, disminuyendo por tanto la viscosidad sanguínea. Así, un aumento de la viscosidad sanguínea, de los niveles de fibrinógeno, de la agregación eritrocitaria y/o de la rigidez de los hematíes pueden asociarse a eventos trombóticos (Alfred L et al., 1983).

2.2.3 Agregación eritrocitaria

Actualmente es totalmente aceptada la participación de los fenómenos fisicoquímicos y mecánicos en las interacciones célula-célula y célula-endotelio, mediadas por las interacciones célula-macromoléculas, disparadoras de las diferentes formas de oclusión vascular y de disfunción circulatoria. Las interacciones entre las células sanguíneas que conducen a la formación de agregados eritrocitarios excesivamente resistentes a la disociación, han sido frecuentemente observadas en situaciones patológicas como por ejemplo la diabetes (McMillan D, 1993).

Los agregados se producen debido a fenómenos de atracción y repulsión, siendo un balance entre las fuerzas de atracción de Van der Waals (creadas por adhesión de las proteínas plasmáticas las que forman puentes de unión entre los eritrocitos), las fuerzas electrostáticas de repulsión (debidas a las cargas superficiales de la membrana eritrocitaria) y las de tensión superficial. Es decir, desde un punto de vista teórico, la agregación puede aproximarse como un equilibrio energético entre las fuerzas de atracción y las de repulsión (Toderi M et al., 2017, 2020, 2022).

En la Figura 2.4a se observa un ejemplo de como en condiciones normales, los glóbulos rojos a bajas velocidades de corte o en reposo forman *rouleaux*, situación en la cual los eritrocitos se adhieren entre sí enfrentando sus superficies cóncavas para formar agregados que adoptan la forma de pilas de monedas. En condiciones anómalas, como por ejemplo en la diabetes, la agregación puede conducir a agregados eritrocitarios en forma de aglomerados esferoidales de gran tamaño (Figura 2.4b) llamados *clusters* (McMillan D, 1993). Generalmente esta anomalía está asociada con niveles reducidos del ácido siálico de la membrana (Carrera L. et al., 2008.) con la consecuente reducción de la carga eléctrica superficial, y con factores extracelulares como el incremento del contenido del fibrinógeno plasmático o la hiperglucemia (Bergan J et al., 2006).

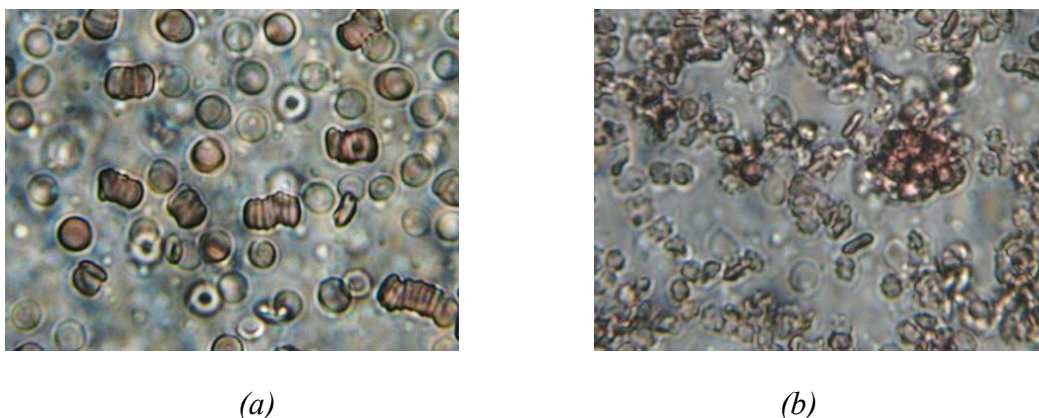


Figura 2.4. Imágenes de glóbulos rojos agregados: (a) en forma de pila de monedas (rouleaux); (b) en forma de aglomerado globular (cluster). Imágenes Digitales obtenidas en el Área Física, FCByF (UNR) (microscopio óptico invertido Union Optical, Japón; objetivo 40x; cámara digital acoplada).

2.2.4 Alteraciones hemorreológicas en la diabetes

Las muestras de sangre de pacientes diabéticos muestran una alteración en los parámetros de agregación eritrocitaria (Foresto P et al., 2002; Delannoy M et al., 2014) al igual que en las propiedades mecánicas de la membrana de los GR (Le Devehat C et al., 2004; Babu N et al., 2005). Además, numerosos estudios en la DBT2, han detectado anomalías hemorreológicas importantes como son el aumento de la viscosidad intracelular de los GR debido a los altos niveles de hemoglobina glucosilada, lo cual conduce a una reducción de la deformabilidad eritrocitaria (Lapolla A et al., 1991; Paarvanova B et al., 2013) y una disminución del contenido en el ácido siálico de las glicoforinas en las membranas de eritrocitos, determinante de la carga negativa en la superficie celular y asociado con un aumento en la agregación de GR (Carrera L et al., 2008). Por otra parte, el aumento de la agregación eritrocitaria relacionado con el significativo incremento en las concentraciones de las proteínas plasmáticas (especialmente el fibrinógeno), conducen a un aumento de la viscosidad sanguínea, conocido como hiperviscosidad sanguínea (Foresto P et al., 2000).

También, algunos autores han sugerido que la hiperagregabilidad eritrocitaria está asociada con otros factores de riesgo vascular, como por ejemplo la obesidad (Poggi M et al., 1994.), la hipertensión (Meiselman H et al., 1999; Razavian S et al., 1992; Filippini F, 2012), la dislipidemia (Vallá A et al., 1993; Simon E et al. 1995) al igual que la diabetes (Khodabandehlou T et al., 1996), siendo un parámetro que es ampliamente utilizado como un indicador de riesgo cardiovascular (Kiesewetter H et al. 1988; Rainer C et al., 1987).

Particularmente, la DBT2 representa el mayor factor de riesgo para las enfermedades isquémicas cardiovasculares y cerebrovasculares (Alet A et al., 2001). Al principio, los cambios microcirculatorios son reconocidos por una reducción del flujo capilar y una pérdida de la autorregulación capilar. Las alteraciones del flujo sanguíneo observadas en pacientes DBT2 están evidenciadas en la retinopatía diabética y en el pie diabético (Giansanti R. et al., 1995), debidas principalmente a la alteración de la viscoelasticidad eritrocitaria (Lapolla A et al., 1991; Torregiani F et al., 1995; Riquelme et al., 2003, 2006), un incremento de la viscosidad sanguínea y plasmática (Kulkarni M et al., 1994) y un aumento de la agregación eritrocitaria, observándose la formación de los agregados anormales llamados *clusters*, que difieren de los *rouleaux* observados en muestras de dadores sanos (Lebensohn N et al., 2006; D'Arrigo M et al., 1999; Foresto P et al., 2000; Delannoy M, 20014, 2015).

La glicación (glucosilación no enzimática) ocurre en condiciones fisiológicas y es uno de los mecanismos por el cual la glucosa puede dañar el endotelio vascular, ya que en el caso de la DBT2 se encuentra patológicamente aumentada, sobre todo en períodos de descompensación metabólica. El proceso de glicación se define como el ataque directo de la glucosa sobre el grupo épsilon amino de la lisina de las proteínas plasmáticas y tisulares, o al grupo alfa amino terminal de la cadena polipeptídica, o a los grupos amino de las bases de los ácidos nucleicos. La glicación trae como consecuencia que las proteínas nativas modifiquen su estructura, sus propiedades fisicoquímicas y sus funciones biológicas. El grado de glicación dependerá de la concentración de glucosa en el medio y del tiempo de vida media de la proteína. Esta modificación trae aparejada cambios funcionales y estructurales. En proteínas de mayor vida media, como por ejemplo el colágeno y otras proteínas de los vasos, y en pacientes con altos niveles de glucemia, las uniones entre la glucosa y las proteínas se tornan irreversibles (glucosilación avanzada irreversible). Los productos de la glucosilación avanzada irreversible, alteran la interacción entre las proteínas y los proteoglicanos aniónicos en la membrana basal de los vasos, lo cual produce un aumento de la permeabilidad de los capilares.

2.3 Modelización *in vitro* de la glicación eritrocitaria por hiperglucemia

A fin de modelizar *in vitro* en forma controlada el proceso de glicación que ocurre por la hiperglucemia en la diabetes, los glóbulos rojos se incuban con soluciones de glucosa. La glicación *in vitro* de los glóbulos rojos difiere de la glicación *in vivo* particularmente en

los cambios fisiológicos, el metabolismo de la glucosa y la renovación continua de los glóbulos rojos en el sistema circulatorio sanguíneo. Sin embargo, resulta de utilidad estudiar en forma controlada las alteraciones en glóbulos rojos incubados en medios a diferentes concentraciones de glucosa, dado que se puede observar el efecto específico de la glicación sin la influencia de las comorbilidades relacionadas con la diabetes (Alet A et al. 2015; Batista M et al., 2022).

Varios investigadores han propuesto diferentes protocolos para la glicación controlada *in vitro*, donde las alteraciones de los glóbulos rojos fueron evaluadas con diferentes técnicas experimentales (Raftos DA et al., 2001; Resmi H et al., 2005; Riquelme B et al., 2005; Buszniez P et al., 2017; Lerda N et al., 2017). En estos ensayos, se correlacionó el nivel de glicación con las alteraciones bioquímicas y hemorreológicas debido a la incubación de los glóbulos rojos con soluciones de glucosa en un amplio rango de concentraciones, según el objetivo del estudio. En todos los casos, los valores de glucosa fueron superiores a los que se encuentran en condiciones fisiológicas *in vivo* para lograr *in vitro* el efecto de glicación.

De acuerdo con el análisis bioquímico estándar, el ayuno normal (sin alimentos durante ocho horas) el nivel de azúcar en sangre está entre 0,070 g/dl y 0,099 g/dl. La prediabetes se diagnostica entre 0,100 g/dl y 0,125 g/dl, y la diabetes cuando la glucemia en ayunas es igual o superior a 0,126 g/dl (American Diabetes Association, 2019).

2.4 Fitoquímicos seleccionados para su evaluación

Existe gran variedad de compuestos químicos encontrados en extractos vegetales que serían los responsables de la actividad antidiabética descrita en la bibliografía (Adams et al., 2014, Koupý et al., 2015, Ríos J et al., 2015). Entre estos, los compuestos más frecuentemente nombrados son: saponinas, flavonoides, cumarinas, alcaloides, ácidos fenólicos y fitosteroles, o sus derivados. De plantas mundialmente utilizadas para el tratamiento de la diabetes, las especies autóctonas *Phyllanthus sellowianus* (Sarandí Blanco) y *Bauhinia forficata* (Pezuña de Vaca) son las que resultan de mayor interés para nuestra región.

El Sarandí Blanco, *Phyllanthus sellowianus* Müll Arg. (Euphorbiaceae), es un arbusto que crece a orillas de ríos y arroyos en regiones templadas y húmedas de nuestro país. Estudios realizados por Hnatyszyn *et al.* encontraron que la administración del extracto acuoso de corteza de *Phyllanthus sellowianus* disminuye en forma significativa el nivel

de glucosa en ratas con diabetes inducida (Hnatyszyn O et al., 1996, 1997). Los análisis fitoquímicos han revelado la presencia de diferentes compuestos, tanto en las hojas como en la raíz, el leño y la corteza, como el triterpeno pentacíclico fillantol, una biflavona, los flavonoides rutina y **quercetina**, ácido clorogénico, fitoesteroles (estigmasterol, campesterol y **β-sitosterol**) y cumarinas: isofraxidina y escopoletina (Hnatyszyn O et al., 1999). Los resultados previos (Buszniez P et al., 2012, 2013, 2014) indicarían que existe una alteración de los parámetros hemorreológicos por la acción *in vitro* de extractos de corteza de sarandí blanco, la cual varía de acuerdo con la técnica de extracción utilizada. El árbol de *pezuña de vaca* (*Bauhinia forficata*), también conocido como pata de buey o árbol de las orquídeas, ha probado ser un remedio efectivo para disminuir la glicemia en pacientes que sufren DBT2, con una reducción y/o normalización de la hemoglobina glucosilada (Tolozá-Zambrano P, 2015). De los extractos de pezuña de vaca se han obtenido los fitoesteroles: **β-sitosterol** y estigmasterol. Los principales compuestos identificados en las hojas de *B. forficata subsp. pruinosa* a los cuales se les atribuye propiedades hipoglucemiantes corresponden al alcaloide **trigonelina** y al flavonoide rutina (**quercetina-3-O-rutinósido**). Estudios en animales (ratas y conejos) mostraron un efecto hipoglucemiante tras la exposición aguda a extractos acuosos, hidroalcohólicos y etéreos de hojas de *B. forficata*, con una disminución de los niveles de glicemia entre un 39-41% (Barreto Silva F et al., 2002; Fuentes O et al., 2004). Un estudio *in vitro* evidenció que diferentes fracciones de un extracto metanólico de *B. forficata* producen una estimulación de la captación de glucosa en las células de glándulas gástricas aisladas de conejos normales y diabéticos, sugiriendo que el extracto ejerce un efecto similar al de la insulina, al favorecer el consumo de glucosa en los tejidos periféricos (Fuentes O et al., 2006).

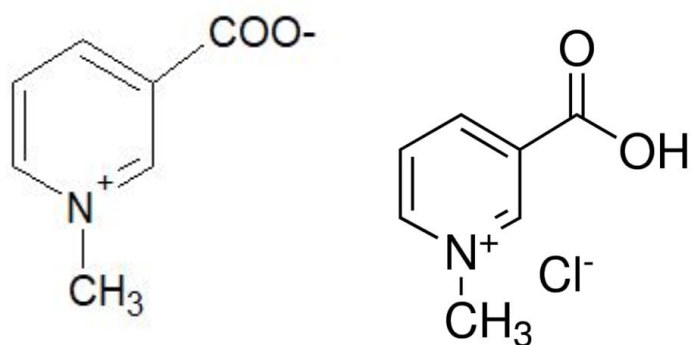
De acuerdo a lo concluido por Hussain y Marouf (Hussain S et al., 2013), a pesar de los datos alentadores de los estudios *in vitro* y en animales, los efectos de los polifenoles (como ser flavonoides, flavonas, ácidos fenólicos) sobre la homeostasis de la glucosa en los seres humanos no han sido declarados de forma coherente. Estos autores señalan además, que a pesar de la escasez de datos concluyentes que muestren resultados beneficiosos para la salud asociados con los flavonoides en los seres humanos, estos compuestos ya tienen un valor comercial elevado, por lo cual existe una urgente necesidad de realizar más investigación en este ámbito, ya que la prescripción de los flavonoides como coadyuvantes para controlar la diabetes presentan una perspectiva muy interesante. Dentro de las actividades farmacológicas de los compuestos flavonoides se pueden

mencionar entre otras: antihemorrágicos, antiarrítmicos, protectores de la pared vascular o capilar, antiinflamatorios, antirradicales libres, antihepatotóxicos, diuréticos y antiurémicos. Por otra parte, estos compuestos pueden contribuir a la mayor capacidad antioxidante del plasma (Olthof M et al., 2001). Dicha actividad antioxidante podría ser de importancia en el caso de la diabetes, dado que esta patología se caracteriza por un mayor estrés oxidativo (Natella F et al., 2002). En consecuencia, para elucidar el mecanismo de acción de los flavonoides aplicable al tratamiento de la diabetes y sus potenciales efectos terapéuticos, es necesario conocer los mecanismos moleculares implicados (Ríos, J L et al., 2015, 2016).

Por lo anteriormente expuesto, de todos los componentes químicos identificados en Sarandí y Pezuña de Vaca, este estudio se centraliza en tres de ellos: **quercetina** (perteneciente al grupo de flavonoides), **trigonelina** (clasificado como alcaloide) y **β -sitosterol** (perteneciente al grupo de fitosteroles). Asimismo, toda información que pueda brindarse sobre estos compuestos será un valioso aporte a la Biomedicina, que contribuirá al diseño y desarrollo de nuevas drogas y su viabilidad (hemocompatibilidad) para la formulación de posibles formas farmacéuticas.

2.4.1 Trigonelina (T)

La **trigonelina** ha sido identificada en las hojas de Pezuña de Vaca y en semillas de café y de fenogreco (Tolozza-Zambrano P et al., 2015). Se trata de un alcaloide del grupo de la piridina con fórmula química $C_7H_7NO_2$ (Figura 2.5) formado a partir de la metilación enzimática del átomo de nitrógeno de la niacina (Vitamina B3). La **T** es un producto del metabolismo de la niacina que se excreta en la orina de los mamíferos (Bruneton J, 2001). Este compuesto químico es un ion híbrido o zwitterión, eléctricamente neutro, que presenta carga formal positiva y negativa sobre átomos diferentes en su molécula.



*Figura 2.5: Estructura química de **Trigonelina** (a), y de su sal obtenida como standard para análisis (b).*

Comercialmente se dispone del standard para análisis como un polvo blanco, 99 % de pureza, soluble en agua (100 mg/mL; PM = 173.60 g/mol. Lab. Sigma Aldrich, código T-5509, N° CAS 6138-41-6).

Diversos trabajos de investigación han demostrado su actividad hipolipemiante, antiinflamatoria, antioxidante y antidiabética: reduce la hiperglucemia tanto en animales como en humanos, protege las células β del páncreas y aumenta el índice de sensibilidad a la insulina (Koupý D et al., 2015; Khalili M et al., 2018). Además, se ha informado que T mejora eficazmente la función cognitiva y la neuropatía auditiva, exhibe acciones anticancerígenas, mejora la tolerancia a la glucosa en hombres obesos y disminuye el stress oxidativo (Khalili et al., 2018; Farid et al., 2020; Aktar S et al., 2023). Otros estudios demostraron que en ratas con DBT2 inducida con estreptozotocina, el tratamiento con T aumentó tanto el nivel de insulina sérica como el índice de sensibilidad a la insulina, y disminuyó significativamente los niveles de colesterol total y triglicéridos (Barreto Silva F et al., 2002). Además los estudios sobre la neuropatía periférica mostraron que T mejoró significativamente la velocidad de conducción nerviosa motora y sensorial, y la nocicepción, con protección del tejido neuronal, reduciendo el estrés oxidativo en el nervio ciático (Zhou J et al., 2012).

En particular, numerosos autores relacionan el consumo de café con la disminución del riesgo cardiovascular, fundamentando el alto contenido de T presente en esta bebida (Ríos J, 2016; Nehal A, 2016; Talero L et al., 2024).

2.4.2 Quercetina (Q)

En la Figura 2.6 se muestra la estructura química de la **Q**, la cual se clasifica como flavonoide. Estos representan un grupo de compuestos polifenólicos que poseen un núcleo básico de flavano con dos anillos aromáticos, que se encuentran conectados por un anillo heterocíclico oxigenado de tres átomos de carbono. En la naturaleza, se encuentra principalmente como O-glucósido, en donde uno o más grupos azúcar se encuentran unidos a los grupos fenólicos por enlaces glucosídicos. Las propiedades antioxidantes de los flavonoides emergen primariamente de la presencia de grupos hidroxilo fenólicos en su estructura.

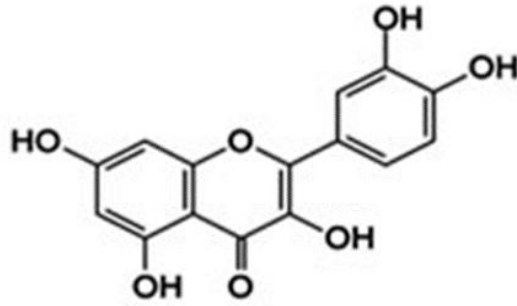


Figura 2.6: Estructura química del flavonoide **quercetina**

Existe gran variedad de estudios biológicos y farmacológicos relacionados con sus efectos sobre sitios claves de la regulación de insulina como potente inhibidor *in vitro* de la enzima 11 β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1), la cual es estimuladora de la acción de la hormona glucocorticoide, antagonista de la insulina y estimuladora de la gluconeogénesis (Sridevi Sangeeta K et al., 2016; Bouyahya A et al., 2024).

De la misma forma se ha demostrado su actividad antidiabética en diferentes modelos de DBT2 experimental, evidenciando que la **Q** protege a las células β pancreáticas del estrés oxidativo producido por la administración de Streptozotocina (SZT) en ratas, debido a una potente actividad antioxidante (Coskun O et al., 2005; Ortiz H et al., 2009).

Además, el compuesto químico **Q** presenta especial interés debido a sus propiedades antioxidantes o prooxidantes (Procháskková D. et al., 2011). En diversas investigaciones se han constatado sus efectos anti-inflamatorios, antivirales o antialérgicos, y en especial su papel protector y antitrombótico en las enfermedades cardiovasculares. Sus efectos citoprotectores han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica de los fosfolípidos de las membranas y la peroxidación en los glóbulos rojos (Pérez Trueba G, 2003).

Como ya se ha mencionado, en la diabetes se produce un aumento de la producción de radicales libres del oxígeno y del nitrógeno, de lo cual es fundamentalmente responsable la hiperglucemia crónica que manifiestan los individuos afectados por esta enfermedad metabólica. Existe una fuerte evidencia experimental que indica que el estrés oxidativo puede determinar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías de la DBT2, se ha demostrado que existe un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y una disminución de las defensas antioxidantes en los sujetos diabéticos (González Sánchez A, 2011). Por lo tanto, se sugiere que la actividad antidiabética de

este fitoquímico podría ser un producto secundario a su actividad antioxidante, aunque no se encontraron resultados concluyentes sobre los marcadores del estrés oxidativo. En consecuencia, para elucidar el mecanismo de acción de **Q** aplicable al tratamiento de la diabetes y sus potenciales efectos terapéuticos, es necesario conocer los mecanismos moleculares implicados (Duarte J & Pérez Vizcaíno F, 2015).

En una revisión de *Science Direct, Alternative Therapies* (Jorge A et al., 2004; Thangasamy T et al., 2009; Ji Young L et al., 2013; Perez Trueba G, 2013; Eseberri I et al., 2019, 2021) se describen los efectos obtenidos en función de las siguientes concentraciones de **Q**:

Bajas dosis 0 a 10 μM : quimioprevención

Dosis medias 10 a 200 μM : efectos mixtos

Dosis altas > 200 μM : prooxidante o potenciales propiedades terapéuticas.

2.4.3 β -sitosterol (BS)

Los niveles de colesterol y triglicéridos elevados acompañan con frecuencia a la DBT2, lo cual implica un riesgo cardiovascular. Además, la evidencia epidemiológica ha confirmado la teoría lipídica de la arteriosclerosis. Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que las poblaciones con una ingesta elevada de grasas de origen animal presentan niveles de colesterol más elevados y mayor morbimortalidadⁱ cardiovascular (Arrieta F et al, 2015). Es más, la incidencia de cardiopatía isquémica está en relación directa con la hipercolesterolemia incrementando el riesgo de sufrir un episodio coronario. Por lo tanto, el colesterol sérico elevado es también un factor de riesgo para accidente vascular cerebral y enfermedad vascular periférica (Cuevas A & Alonso R, 2016).

Los fitosteroles son esteroides vegetales que poseen una estructura química muy similar al colesterol y pueden ser utilizados para tratar la hipercolesterolemia (Brufau G et al., 2008). Además de la actividad antidiabética de los fitosteroles, también se describen propiedades como inmunomoduladores, anticancerígenos, antiinflamatorios y antiulcerosos, aunque el mecanismo de acción por el cual producen algunas de estas acciones no se conoce exactamente (Hung Llamas B et al., 2005).

Los estudios realizados sobre las propiedades de los fitosteroles indican que reducen la absorción del colesterol, desplazándolo de las micelas que lo solubilizan como paso

ⁱ Tasa de muertes por enfermedad en una población y en un tiempo determinados (RAE).

previo a su absorción por un transportador activo del enterocito (Muñoz Jáuregui A et al., 2016). Gran variedad de fitosteroles se encuentran en el Sarandí y en la Pezuña de Vaca siendo los más abundantes: **β -sitosterol (BS)**, campesterol y stigmasterol. En la Figura 2.7 se muestra la fórmula química de **BS** y su similitud con la molécula de colesterol.

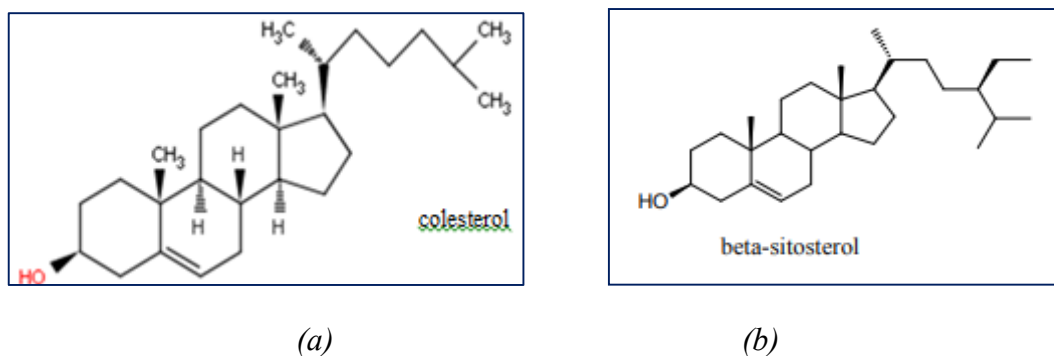


Figura 2.7: Estructuras químicas de colesterol (a) y **β -sitosterol** (b).

Actualmente, el tratamiento de la hipercolesterolemia incluye una clase de fármacos conocidos como estatinas que disminuyen la síntesis endógena de colesterol en el hígado, pero pueden producir diversos efectos adversos como rabdomiólisis con dolor muscular extremo, daño hepático y confusión mental entre los más graves (Rosenson R et al., 2017). En comparación con las prescripciones de medicamentos de rutina, el agregado de fitoesteroles a la dieta, como por ejemplo el **BS**, puede considerarse una estrategia farmacológica viable. Sin embargo, la cantidad de **BS** que las personas reciben a través de la dieta a menudo no es suficiente para reducir significativamente el colesterol en la sangre (Silva P et al., 2016). Además, la incorporación exitosa de **BS** en preparados farmacológicos o alimentos es realmente un desafío porque tiene baja solubilidad, tanto en agua como en aceite. Por ello, la eficacia del **BS** para disminuir el colesterol depende estrictamente de las propiedades fisicoquímicas y de la formulación farmacéutica (Salehi B et al., 2021).

Además, la estructura microcristalina del **BS** aumentaría la dosis-respuesta debido a una disolución modificada en los fluidos del intestino delgado. En consecuencia se han estudiado diversas formulaciones farmacéuticas (Morales S et al., 2013) observando que la encapsulación de fitoesteroles y las formulaciones dispersables en agua mejoran su solubilidad y estabilidad, y se espera que proporcionen una mayor actividad reductora del colesterol. Esto permitiría producir una amplia variedad de productos bajos en grasa

eficaces para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, se han desarrollado fórmulas con transportadores de lípido nanoestructurado (NLC) que consisten en una matriz lipídica sólida que atrapa un lípido líquido (aceite) como nanocompartimentos dispersos en una solución acuosa de tensioactivo. Se ha reconocido que su principal beneficio es la administración oral de nutraceuticos poco solubles en agua, aportando una mayor solubilidad y bioaccesibilidad al sitio de acción, así como un control de la liberación del compuesto bioactivo (Soleimanian Y et al., 2020).

Hipótesis

Los fitoquímicos **trigonelina**, **quercetina** y **β -sistosterol**, presentes en las plantas autóctonas como Pezuña de Vaca y Sarandí Blanco utilizadas popularmente para el tratamiento de la DBT2, inducen cambios estructurales en la membrana eritrocitaria modificando sus propiedades mecánicas y su carga superficial eléctrica, y revierten las alteraciones en la viscoelasticidad y agregación eritrocitaria producidas por la hiperglucemia.

Objetivo general

Estudiar la posible actividad hemorreológica de tres fitoquímicos comerciales (**trigonelina**, **quercetina** y **β -sitosterol**) presentes en dos plantas autóctonas utilizadas popularmente para el tratamiento de la diabetes como lo son *Bauhinia forficata* (Pezuña de vaca) y *Phyllanthus sellowianus* (Sarandí blanco). Brindar información que permita en el futuro, relacionar estos 3 compuestos fitoquímicos con su actividad farmacológica, para su posible uso como coadyuvante en el tratamiento de la DBT2. Además, analizar la hemocompatibilidad de los fitoquímicos comerciales mencionados, información que será de utilidad para evaluar su posible administración como fórmula farmacéutica inyectable.

Objetivo específico

Estudiar la acción *in vitro* sobre los glóbulos rojos humanos de los compuestos fitoquímicos **trigonelina**, **quercetina** y **β -sistosterol** disponibles comercialmente. Analizar particularmente la acción en las propiedades mecánicas y de agregación de GR con alteraciones similares a las producidas por la hiperglucemia en pacientes con DBT2, mediante la modelización por glicación *in vitro* de glóbulos rojos de dadores sanos. Particularmente se pretende evaluar la acción sobre los parámetros viscoelásticos y de agregación eritrocitaria, factores que generalmente se encuentran alterados en la DBT2 tal como se describió en la introducción.

3 – Desarrollo

3.1- Materiales y métodos

3.1.1 Material biológico y preparación de muestras

Muestras de glóbulos rojos humanos

Para cada fitoquímico a ensayar se utilizaron como unidades de análisis 10 muestras de sangre de dadores sanos (entre 20 y 35 años de edad de ambos sexos). La extracción y el procesamiento de las muestras de sangre de los donantes fue supervisada por la Dra. Mabel D'Arrigo. La supervisión y selección de los donantes sanos fue realizada por el Dr. Fernando Filippini (Área Clínica Médica - Hospital Provincial del Centenario, Rosario), teniendo en cuenta los siguientes criterios de exclusión:

- Fumador
- Alcohólico
- Hipertenso
- Diabético
- Con Síndrome metabólico y obesidad (IMC > 30)
- Hipotiroideo, hipertiroideo
- Insuficiente renal
- Insuficiente hepático
- Cirrótico
- Dislipémico, con hipertrigliceridemia (> 200 mg/dL), hipercolesterolemia (> 240 mg/dL), o bajo colesterol HDL (< 35 mg/dL)
- Con trastornos hematológicos o endócrinos
- HIV (+)
- Patologías infectocontagiosas
- Inmunocomprometido
- Medicado

Previamente, los dadores fueron invitados a participar en el proyecto firmando el respectivo consentimiento informado (Apéndice D). En todo momento se respetaron las normas de buena práctica clínica y los postulados éticos de la declaración de Helsinki y sus posteriores actualizaciones.

Las muestras fueron obtenidas por punción venosa y anticoaguladas con EDTA-K₂, se conservaron a temperatura ambiente y se utilizaron inmediatamente luego de la extracción, de acuerdo a las recomendaciones de la International Society of Clinical Hemorheology (International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods, 2009) (Apéndice B-1).

Los GR fueron separados por centrifugación, descartando la capa leucoplaquetaria y almacenando el plasma para los estudios de agregación. Luego, fueron tratados *in vitro* de acuerdo a los respectivos protocolos ya estandarizados para cada determinación hemorreológica (Apéndice B-2). Una vez finalizadas las experiencias, las muestras fueron descartadas de acuerdo a las normas de bioseguridad vigentes en los laboratorios de trabajo.

Los medios de suspensión utilizados (PBS, PVP) se encuentran detallados en los Apéndices A-1 y A-2.

Glicación in vitro de glóbulos rojos

Se obtuvieron muestras de GR glicados (**GRg**) modelizando *in vitro* las alteraciones en la membrana eritrocitaria debido a la hiperglucemia, como ocurre en la diabetes.

Para seleccionar las concentraciones óptimas de glucosa, se realizaron ensayos preliminares incubando **GR** de los dadores sanos con soluciones de diferentes concentraciones (0,2 g/dL, 0,4 g/dL, 0,6 g/dL, 0,8 g/dL y 1 g/dL, 2 g/dL) a 37°C con agitación controlada (Apéndice B-4).

En todos los casos, luego de transcurrido el tiempo de incubación, los **GR** se lavaron una vez con PBS para quitar el remanente de glucosa. Además, en todas las etapas del procesamiento de las muestras se registró si se observó o no la presencia de hemólisis.

Para la evaluación de las alteraciones reológicas de la membrana eritrocitaria con las distintas técnicas, se prepararon suspensiones de eritrocitos al 40% en plasma autólogo, tanto con los **GR** controles como con los **GRg**.

Como se verá más adelante en la sección Resultados 3.2.1, se eligió como protocolo óptimo el que utiliza los **GR** lavados incubados con una solución de glucosa en PBS a la concentración 0,4 g/dL, la cual es equivalente a un valor de glucemia de 240 mg/dL en un paciente diabético.

Fitoquímicos estudiados

Se utilizaron los siguientes compuestos adquiridos en el laboratorio comercial Sigma-Aldrich:

- **T: trigonelina** (Catálogo N° 000010 T5509) alcaloide presente en la Pezuña de Vaca.
- **Q: quercetina** (Catálogo N° 000070 Q4951) flavonoide presente en Pezuña de Vaca como **quercetina-3-O-rutinósido** y en el Sarandí.
- **BS: β -sitosterol** (Catálogo N° 000040 85451) fitosterol presente en la Pezuña de Vaca y en el Sarandí.

Tratamiento de los GR con los fitoquímicos

Para estudiar la acción de los fitoquímicos en la membrana eritrocitaria, se incubaron volúmenes iguales de **GR** lavados con las soluciones de los fitoquímicos preparadas a distintas concentraciones en PBS o solvente orgánico, según la solubilidad de los mismos tal como se detalla en el Apéndice B. La incubación con los fitoquímicos se realizó a 37°C bajo agitación controlada durante 60 minutos. Como control se utilizó una alícuota de cada muestra incubada de la misma forma, pero con un volumen igual de PBS. Una vez finalizado el tiempo de incubación, los **GR** fueron lavados 1 vez con solución PBS. Se analizó y registró la presencia de hemólisis y/o aglomerados macroscópicos de **GR**.

3.1.2 Viscoelasticidad eritrocitaria

Luego de establecidas las condiciones de ensayo para cada fitoquímico, se realizaron las respectivas incubaciones y las determinaciones con el Reómetros Eritrocitario en las muestras glicadas y en los controles (**GR** y **GRg**) con el fin de evaluar las posibles alteraciones en la viscoelasticidad eritrocitaria.

Se utilizó el Reómetro Eritrocitario (Riquelme B et al., 2013: Patente de Invención AR 091467 B1), instrumento desarrollado y patentado en el Grupo de Física Biomédica del Instituto de Física Rosario (IFIR, CONICET-UNR), basado en la técnica de difracción láser (Rasia RJ et al., 1986; Riquelme B et al., 1999, 2003). Está constituido por dos discos planos de cristal transparente e incoloro, superpuestos, coaxiales, paralelos y horizontales (Figura 3.1). Entre ambos discos, hay una separación uniforme y regulable en la que se introduce la muestra. El disco superior es fijo y el inferior gira a una velocidad regulable. El movimiento del disco inferior es realizado por un motor, que es alimentado por una fuente ajustable.

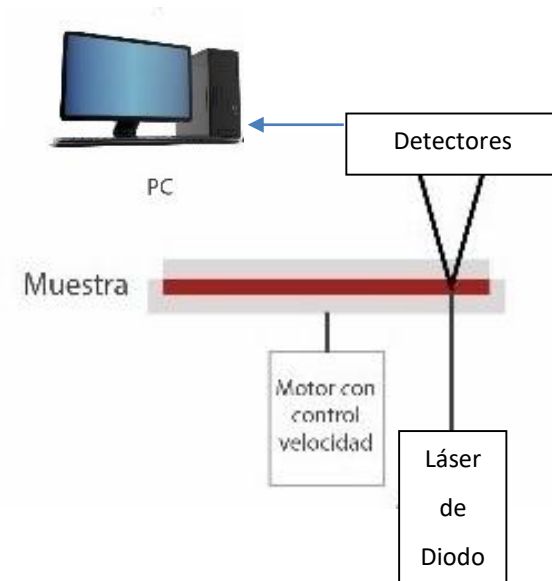


Figura 3.1: Fotografía y esquema del Reómetro Eritrocitario

En el régimen estacionario, el disco inferior gira a una velocidad constante permitiendo registrar las curvas de carga y descarga al detenerse. En el régimen dinámico (oscilatorio), el disco inferior se mueve con una velocidad que oscila sinusoidalmente con frecuencias controlables de 0,5 Hz, 1 Hz y 1,5 Hz (equivalentes a 30, 60 y 120 latidos por minuto respectivamente), permitiendo la obtención de curvas sinusoidales a partir de las cuales se calculan los parámetros viscoelásticos dinámicos de la membrana eritrocitaria.

El patrón de difracción de las células es producida por un haz láser (633 nm) que atraviesa perpendicularmente la suspensión de eritrocitos. A medida que los GR se deforman, el patrón de difracción cambia de circular a elíptico (Figura 3.2a y b). En consecuencia, las características geométricas del patrón de difracción están relacionadas con la deformabilidad de los eritrocitos bajo la tensión de corte que es aplicada a los glóbulos rojos entre los discos.

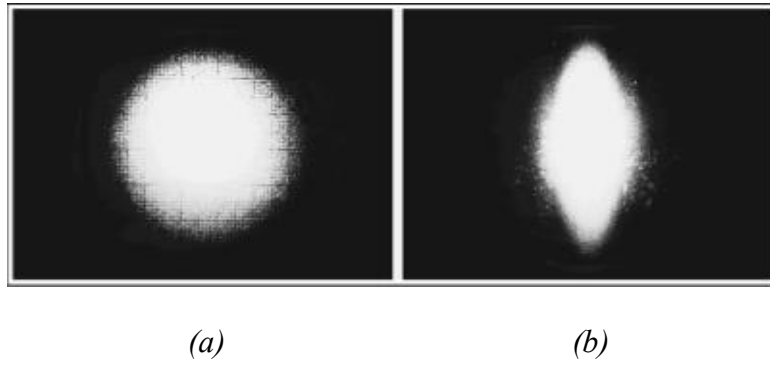


Figura 3.2: Patrón de difracción: (a) circular del eritrocito en reposo y (b) elíptico correspondiente a los eritrocitos deformados bajo una tensión de corte.

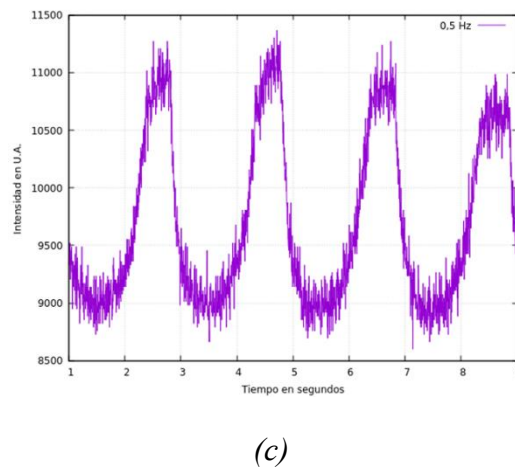
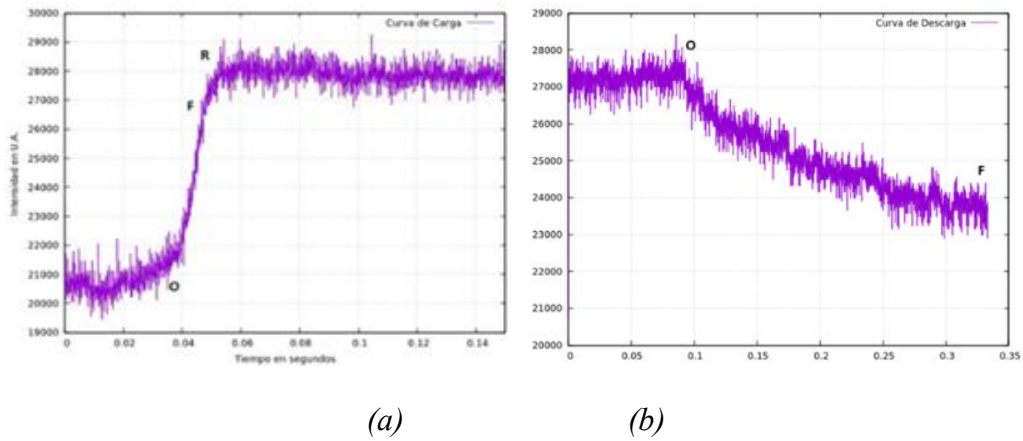


Figura 3.3: (a) curva de carga y (b) curva de descarga correspondientes a los eritrocitos en régimen estacionario; (c) curva sinusoidal correspondiente a los eritrocitos en régimen dinámico.

Mediante el análisis con el software especialmente diseñado de las curvas de carga y descarga en régimen estacionario (Figura 3.3a y b) y de las sinusoidales en régimen dinámico (Figura 3.3c), se obtienen los siguientes parámetros viscoelásticos de los eritrocitos tratados con los fitoquímicos y de los controles (**GRg** y **GR**):

- **ID**: índice de deformabilidad
- **μ**: módulo elástico de la membrana del GR
- **η_m**: viscosidad superficial de la membrana del GR
- **δ**: desfase entre la tensión y la deformación sinusoidales
- **G'**: módulo de almacenamiento
- **G''**: pérdida dinámica

El **ID** se determina en función de las dimensiones que adquiere el patrón de difracción de la población de eritrocitos cuando se deforman por la acción de una tensión de corte constante, y se define por la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{D-d}{D+d} \quad (1)$$

Siendo *D* el diámetro mayor y *d* el diámetro menor del patrón de difracción correspondiente a una población de eritrocitos sometidos a una deformación estacionaria. En la Figura 3.3a y b se presenta un ejemplo de las curvas de crecimiento de la deformación (carga) y recuperación (descarga) de la forma de los eritrocitos que permiten determinar la **η_m** que es una medida de la fluidez relacionada con la bicapa lipídica, y el **μ** que mide la elasticidad de la membrana, la cual se relaciona fundamentalmente con la estructura del citoesqueleto.

En la Figura 3.3c se presenta un ejemplo de las curvas obtenidas en régimen oscilatorio de las cuales se determina el desfase **δ** entre la respuesta de los eritrocitos y la tensión de corte aplicada. Este parámetro permite calcular las componentes de la viscoelasticidad dinámica de los eritrocitos (**G'**, **G''**)

La muestra utilizada está constituida por 100μL de cada muestra de los GR al 40% en plasma autólogo, suspendidos en 4,5 mL de la solución de PVP (Apéndice C-2)

3.1.3 Cinética de agregación eritrocitaria

La determinación de los parámetros de cinética de agregación eritrocitaria se realizó utilizando el Agregómetro eritrocitario de chip óptico (Toderi M et al., 2015, 2017; Ciunne M et al., 2017), cuyo diagrama se muestra en la Figura 3.4. Este instrumento, también desarrollado en el Grupo de Física Biomédica (antes llamado Óptica Aplicada a

la Biología) del IFIR (CONICET-UNR), se basa en la técnica de transmisión laser y utiliza sólo 15µL de sangre en la cavidad del chip.

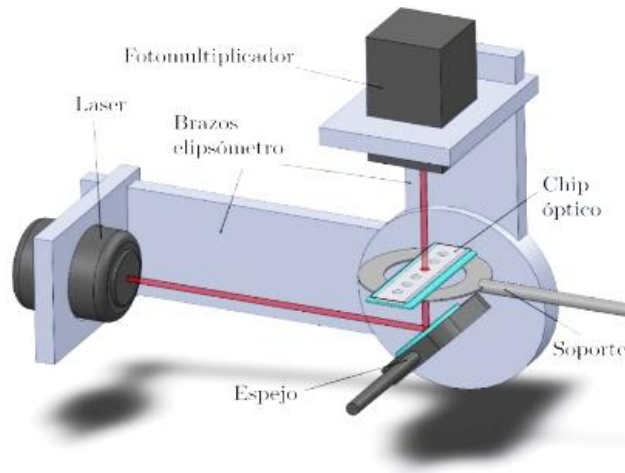


Figura 3.4: Esquema del Agregómetro eritrocitario de chip óptico, equipo utilizado para el estudio de la cinética de disociación y agregación de los GR.

Con este dispositivo se obtienen curvas de la cinética de agregación eritrocitaria llamadas silectogramas que representan la intensidad de luz transmitida en función del tiempo durante el proceso de agregación (Figura 3.5).

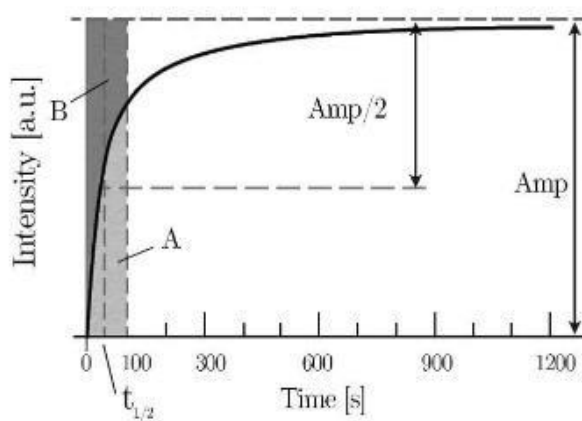


Figura 3.5: Silectograma y visualización de los parámetros de agregación para el caso de $t=100s$.

A partir de estas curvas se calculan los siguientes parámetros de cinética de agregación eritrocitaria con un software especialmente diseñado para tal fin:

- **Amp**: amplitud de la intensidad luminosa en un instante dado, indicando el grado de agregación de glóbulos rojos.

- $t_{1/2}$ (tiempo mitad): tiempo necesario para alcanzar la mitad de la amplitud en la intensidad de la luz ($Amp/2$). Este parámetro está relacionado con la velocidad de agregación eritrocitaria
- **IA** (índice de agregación): es la relación entre el área debajo del silectograma (A) y el área total (A+B) mostradas en la Figura 3.5, en un determinado período de tiempo, indicando la cantidad normalizada de los agregados de eritrocitos acumulados al final de la lectura.

Para realizar este ensayo, se colocaron 15 μ l de los GR (controles o tratados) al 40 % en plasma autólogo, en la cavidad del chip, y se registró la intensidad de luz láser durante 400s (Apéndice C-3).

3.1.4 Análisis digital de imágenes

Se obtuvieron imágenes digitales de cada muestra mediante microscopía óptica convencional utilizando un microscopio óptico invertido (Union Optical) acoplado a una cámara digital (*Mikoba 300 CMOS 3.0*) con un adaptador de 52 mm (Figura 3.6). Se utilizó el software *ISCapture* para el procesamiento de las imágenes.



Figura 3.6: Microscopio óptico invertido acoplado a cámara digital

Para la obtención de las imágenes (Apéndice C-1), se colocó una gota de una suspensión de la muestra de GR en plasma autólogo al 0,3 % en un portaobjeto y se realizaron 5 capturas de imágenes en distintos lugares del campo visual de cada muestra, tal como se describe en la bibliografía (Fontana A et al., 2012; Riquelme B et al., 2015).

Parámetros de agregación eritrocitaria

Se realizó el análisis de la morfología de los agregados de eritrocitos tratados y controles a partir de las imágenes digitales. Se determinaron los siguientes parámetros de agregación eritrocitaria:

Coefficiente de células aisladas (C_{CA})

Se define como la diferencia entre los porcentajes de células individuales iniciales (GR del control) y finales (GR tratados) con relación al porcentaje de células individuales antes del tratamiento (Ponce de León P et al., 2016):

$$C_{CA} = \frac{CA_{inicial} - CA_{final}}{CA_{inicial}} \quad (2)$$

Este coeficiente puede variar entre 0 y 1, siendo C_{CA}= 0 cuando no hay diferencias en la agregación antes y después del tratamiento, y C_{CA}= 1 cuando hay agregación completa después del tratamiento. Este coeficiente permite obtener una cuantificación de la agregación de la muestra tratada relativa al control.

Recuento y clasificación de los agregados

Se realizó un recuento de los agregados, los que fueron clasificados de acuerdo con las cuatro categorías siguientes (Fontana A, et al., 2012):

- células individuales (C.I.)
- agregados de 2, 3 o 4 células
- agregados de 5 o más células
- presencia de redes de agregados de gran tamaño (AMAS)

Posteriormente se calculó el porcentaje correspondiente a cada categoría para cada suspensión eritrocitaria y, finalmente, estos porcentajes fueron promediados para las muestras estudiadas.

Parámetros de forma de los agregados (ASP)

Como se ha mencionado anteriormente el flujo en pequeños vasos es sensible al tamaño y forma de los agregados. Las estructuras agregadas influyen sobre la resistencia microvascular al flujo sanguíneo. Cuando el agregado es de tamaño comparable al diámetro del microvaso, se crea una complicación en la situación de flujo. Así, la morfología de los agregados define el papel de la agregación en la microcirculación (Chen S et al., 1996; Plá L et al., 1999).

El método utilizado en este trabajo ha sido estandarizado para estudiar la morfología de los agregados eritrocitarios, a través de la determinación del parámetro de forma de los mismos (ASP: Aggregate Shape Parameter). Este parámetro adimensional que caracteriza la morfología de los agregados está definido por la siguiente ecuación (Fontana, et al., 2012):

$$ASP = 4\pi A / P^2 \quad (3)$$

donde A es el área proyectada del agregado y P es su perímetro. Este es un parámetro que mide la circularidad de la forma ya que un círculo tiene la máxima relación Área/Perímetro dando un ASP=1. En consecuencia, los valores de ASP varían entre 0 y 1. Los agregados globulares presentan un ASP cercano a 1, mientras que los agregados con forma rectangular (*rouleaux*) tienen un ASP<1. En la Figura 3.7 se representa esquemáticamente el eritrocito y los correspondientes valores de ASP cuando los agregados están en forma de pequeños *rouleaux* (0,64) o son globulares (0,80).

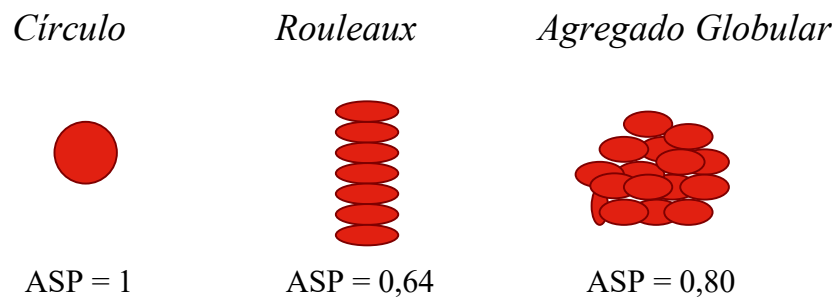


Figura 3.7: Representación esquemática del eritrocito y diferentes formas de agregados y los correspondientes valores de ASP.

Morfología de los eritrocitos

En las mismas imágenes obtenidas mediante microscopía de los eritrocitos tratados y controles se analizó la morfología eritrocitaria determinando la presencia de equinocitos en cada muestra, tal como se presenta en el ejemplo de la Figura 3.8.

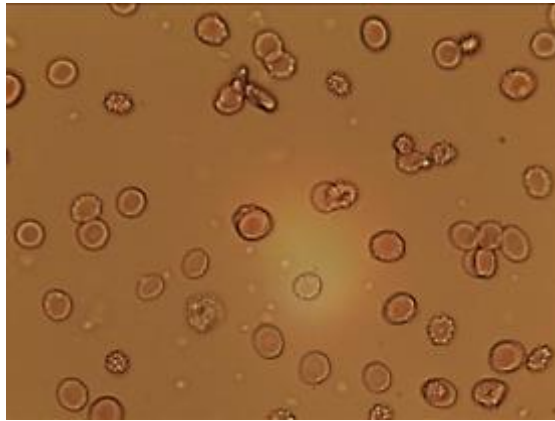


Figura 3.8: Muestra en solución hipertónica con equinocitos.

3.1.5 Parámetros bioquímicos y hematológicos

Previo a los tratamientos y las determinaciones, se realizaron los respectivos análisis de laboratorio para verificar que las muestras de sangre de los dadores sanos se encontraban dentro de las condiciones de inclusión establecidas para la realización de esta tesis. Los parámetros determinados fueron los siguientes:

Parámetros hematológicos

- Glóbulos rojos
- Hemoglobina
- Hematocrito
- Volumen corpuscular medio (VCM)
- Hemoglobina corpuscular media (HCM)
- Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)
- Análisis de distribución eritrocitaria (RDW SD o RDW CD)
- Glóbulos blancos (GB)
- Plaquetas (PQT)
- Volumen plaquetario medio (VPM)
- Velocidad de Eritrosedimentación (1ª hora) (VE)

Parámetros bioquímicos

- Glucemia
- Urea
- Creatininemia
- Transaminasa glutámico oxalacética (GOT)

- Transaminasa glutámico pirúvica (GPT)
- Fosfatasa alcalina
- Triglicéridos
- Colesterol
- Colesterol-HDL
- Ionograma sérico (potasemia, natremia, cloremia)

3.1.6 Análisis estadístico

El estudio comparativo de los datos se realizó por medio de técnicas exploratorias de datos obtenidos de los grupos controles y de los grupos tratados *in vitro*, y con las distintas concentraciones de glucosa para el modelo de glicación *in vitro* y los fitoquímicos seleccionados, discriminando aquellos que presentan desvíos respecto de aquellos que no lo presentan. Se aplicaron técnicas estadísticas adecuadas a las variables consideradas, destacando la relación entre significancias estadísticas.

Todas las mediciones con el Reómetro Eritrocitario se realizaron por quintuplicado y con el Agregómetro de chip óptico por triplicado para cada muestra. Se calcularon los valores medios y los correspondientes desvíos estándares utilizando el programa Excel.

Para analizar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, previamente se definió una variable categórica que etiquetara cada grupo de datos obtenidos con los tratamientos efectuados, así como los datos control sobre los cuales se hicieron las comparaciones. Luego se verificó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk tomando como hipótesis nula “los datos tienen una distribución de probabilidad normal con desvío y esperanza matemática dadas”. Posteriormente se confeccionó un libro Excel con los datos seleccionados para efectuar la estadística paramétrica de hallar los valores de la media y varianza muestral. El análisis estadístico de los resultados se realizó aplicando test estadístico Anova y test Tukey para comparaciones múltiples para cada parámetro, con nivel de significancia del 95%, programa Prism 6, obteniendo los p-valores contra control y para los grupos entre sí. Se asumió que las diferencias eran estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

3.2 Resultados

3.2.1 Glicación *in vitro* de los glóbulos rojos

Análisis digital de imágenes

En las imágenes obtenidas de las muestras incubadas se observan GR aislados y formando *rouleaux* al ser incubados con solución de PBS (Figura 3.9a) o bien formando agregados de distintos tamaños al tratarlos con las soluciones de glucosa de creciente concentración: incubados con Glucosa 0,2 mg/dL tienden a formarse los *rouleaux* de mayor tamaño (Figura 3.9b); con Glucosa 0,4 mg/dL los GR forman agregados globulares o *clusters* (Figura 3.9c); con glucosa 1 mg/dL se observa un agregado globular de gran tamaño (Figura 3.9d).

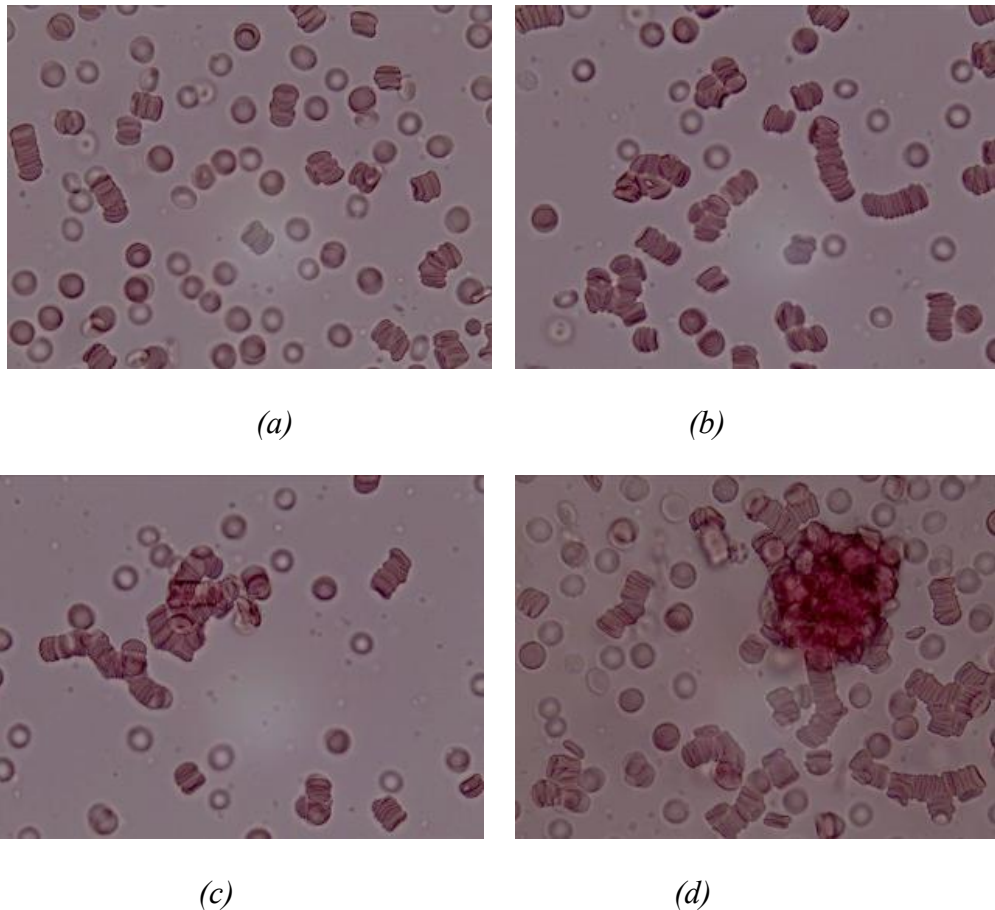


Figura 3.9: Imágenes de glóbulos rojos incubados: (a) en PBS; (b) con solución de glucosa 0,2 mg/dL; (c) con solución de glucosa 0,4 mg/dL; (d) con solución de glucosa 1 mg/dL. Microscopio óptico invertido, objetivo 40x.

Viscoelasticidad eritrocitaria

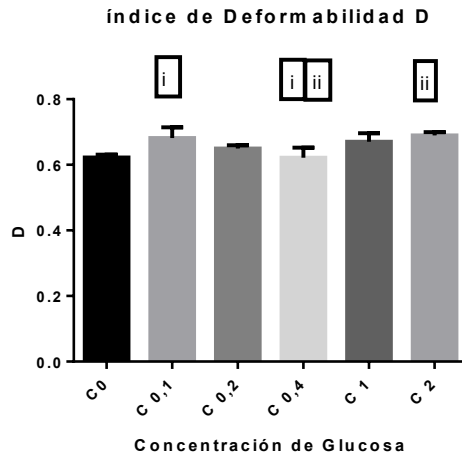
La Tabla 3.1 presenta los resultados de los parámetros estacionarios medidos por quintuplicado con el Reómetro Eritrocitario para las 10 muestras de GR incubados con diferentes soluciones de glucosa. En la Figura 3.10 se presentan las gráficas de los mismos parámetros indicando las diferencias significativas entre las distintas concentraciones de glucosa ensayadas (columnas) según el test Anova + Tukey.

Tabla 3.1: Parámetros viscoelásticos estacionarios de los GR incubados con soluciones de glucosa a distintas concentraciones. Se presenta el valor medio \pm desvío estándar de 10 muestras medidas por quintuplicado.

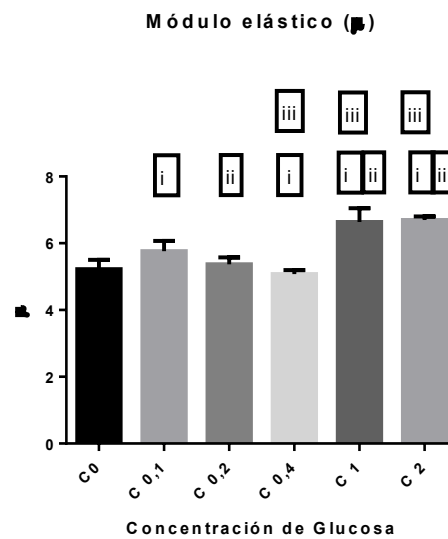
Cc. glucosa [g/dL]	ID	μ [10^{-6} N/m]	η [10^{-7} N.s/m]
0	0,623 \pm 0,008	5,22 \pm 0,8	2,27 \pm 0,14
0,1	0,68 \pm 0,03*	5,76 \pm 0,03	1.80 \pm 0.11*
0,2	0,65 \pm 0,01	6,37 \pm 0,21	1.77 \pm 0.04*
0,4	0,62 \pm 0,03	5,08 \pm 0,01*	2,10 \pm 0,10*
1	0,67 \pm 0,03	6,63 \pm 0,4***	1.74 \pm 0.12**
2	0,69 \pm 0,02**	6,70 \pm 0,10***	1,88 \pm 0,17

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

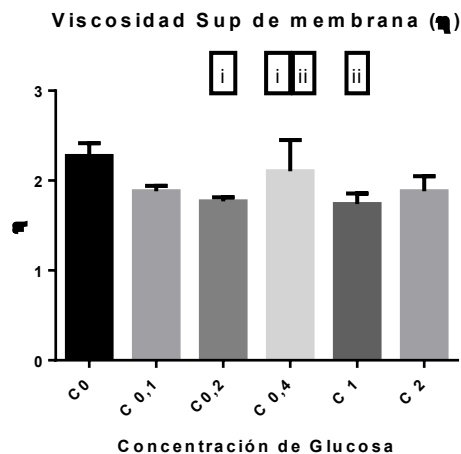
En la Tabla 3.1 se observaron incrementos significativos del ID correspondiente a las muestras incubadas con las soluciones de glucosa 0,1 g/dL y 2 g/dL respecto del control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). Para los GR incubados con las concentraciones de glucosa 0,1 g/dL, 0,4 g/dL y 2 g/dL se observan diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$), tal como se ilustra en la Figura 3.10a. En cambio, μ muestra una leve disminución significativa para la concentración de 0,4 g/dL ($p < 0,05$), y un significativo aumento para 1 g/dL y 2 g/dL ($p < 0,001$) respecto del control. En lo que respecta a las muestras incubadas con dichas concentraciones se observaron diferencias significativas de μ entre todas ellas (Figura 3.10b).



(a)



(b)



(c)

Figura 3.10: Gráfica de los parámetros viscoelásticos: (a) ID, (b) μ y (c) η , de los GR para las distintas concentraciones de glucosa durante la incubación. Con i e ii se indican las diferencias significativas entre las columnas según el test Anova + Tukey.

Además, para η se observan disminuciones significativas para las concentraciones 0,2 g/dL ($p < 0,05$) y 1 g/dL ($p < 0,01$) respecto del control. La muestra incubada con 0,4 g/dL presentó diferencias significativas de η con 0,2 g/dL y 1 g/dL ($p < 0,05$) como se observa en la Figura 3.10c.

Tabla 3.2: Desfasaje obtenido para los GR incubados con distintas concentraciones de glucosa. Valor medio \pm desvío estándar correspondiente a 10 muestras medidas por quintuplicado.

Cc. glucosa [g/dL]	$\delta_{0,5 \text{ Hz}}$ [rad]	$\delta_{1 \text{ Hz}}$ [rad]	$\delta_{1,5 \text{ Hz}}$ [rad]
0	0,22 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	1,09 \pm 0,01
0,2	0,20 \pm 0,04	0,36 \pm 0,02*	1,07 \pm 0,01
0,4	0,25 \pm 0,02*	0,37 \pm 0,01**	1,15 \pm 0,01**
1	0,17 \pm 0,01*	0,24 \pm 0,01*	0,99 \pm 0,01*
2	0,15 \pm 0,02*	0,28 \pm 0,04	0,96 \pm 0,02*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

La Tabla 3.2 muestra los resultados de δ para la viscoelasticidad dinámica (desfasaje entre la elongación del eritrocito y la tensión de corte oscilante) medidos por quintuplicado para cada muestra ensayada. Para la concentración de 0,4 g/dL se observa un aumento significativo de δ respecto del control ($p < 0,05$) para las tres frecuencias ensayadas. En cambio, se observa una disminución significativa de δ para las más altas concentraciones de glucosa en el medio (1 y 2 g/dL).

Cinética de agregación eritrocitaria

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados de los parámetros de cinética de agregación $t_{1/2}$ y IA obtenidos con el agregómetro eritrocitario de chip óptico para diferentes concentraciones de glucosa.

Tabla 3.3.: Parámetros de cinética de agregación de los GR incubados con distintas concentraciones de glucosa. Valor medio \pm desvío standard para 10 muestras medidas por triplicado.

Cc. glucosa [g/dL]	t_½ [s]	IA
0	130 \pm 10	0,63 \pm 0,02
0,1	129 \pm 10	0,75 \pm 0,02*
0,2	133 \pm 10	0,74 \pm 0,02*
0,4	108 \pm 10**	0,80 \pm 0,02**
1	326 \pm 10**	0,86 \pm 0,02**
2	343 \pm 10**	0,85 \pm 0,02**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

En la Tabla 3.3 se observa que el tiempo mitad de agregación no varía significativamente para las concentraciones de glucosa menores que 0,4 g/dL y aumenta significativamente para las concentraciones mayores ($p < 0,01$). El IA aumenta significativamente al incrementarse la concentración de glucosa del medio respecto de la muestra control ($p < 0,05$).

Niveles de glucosa en el medio de suspensión durante la incubación

Se realizó la evaluación de la variación en el tiempo de la concentración de glucosa en el medio durante la incubación de los GR lavados con PBS en soluciones de glucosa a 37°C de acuerdo al protocolo en el Apéndice B-4.

Los datos fueron registrados desde el instante inicial $t=0$, realizándose la medición de la concentración de glucosa en cada muestra mediante el método de hemoglucotest con dispositivo marca Accu-Chek® (Apéndice B-3). Este procedimiento se repitió cada 30 minutos (0,5h; 1h; 1,5h; 2h; 2,5h; 3h; 3,5h; 4h). Los resultados de las mediciones en función del tiempo se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Lectura de glucosa en el medio en función del tiempo durante la incubación de los GR.

Tiempo [min.]	SE	Cc. glucosa [mg/dL]				
		0	0,2	0,4	0,8	1
0	67±1	33±1	73±1	200±2	362±3	408±4
30	48±1	17±1	72±1	188±2	350±3	408±4
60	36±1	ND	62±1	180±2	335±3	395±4
90	27±1	ND	53±1	164±2	306±3	376±3
120	16±1	ND	49±1	155±2	300±3	368±3
150	ND	ND	41±1	144±1	293±3	360±3
180	ND	ND	42±1	170±1	333±3	419±4
210	ND	ND	41±1	161±2	328±3	408±4
240	ND	ND	31±1	153±2	332±3	392±4

ND: No determinado

Con los valores de esta tabla se realizó la gráfica de la Figura 3.11, donde se representó con una línea horizontal el valor de glucosa máximo normal (120 mg/dL). Particularmente, las bajas concentraciones de glucosa (en el rango entre 73 - 100 mg/dL) representan los valores normales de glucemia en el ser humano (Greca et al., 2016).

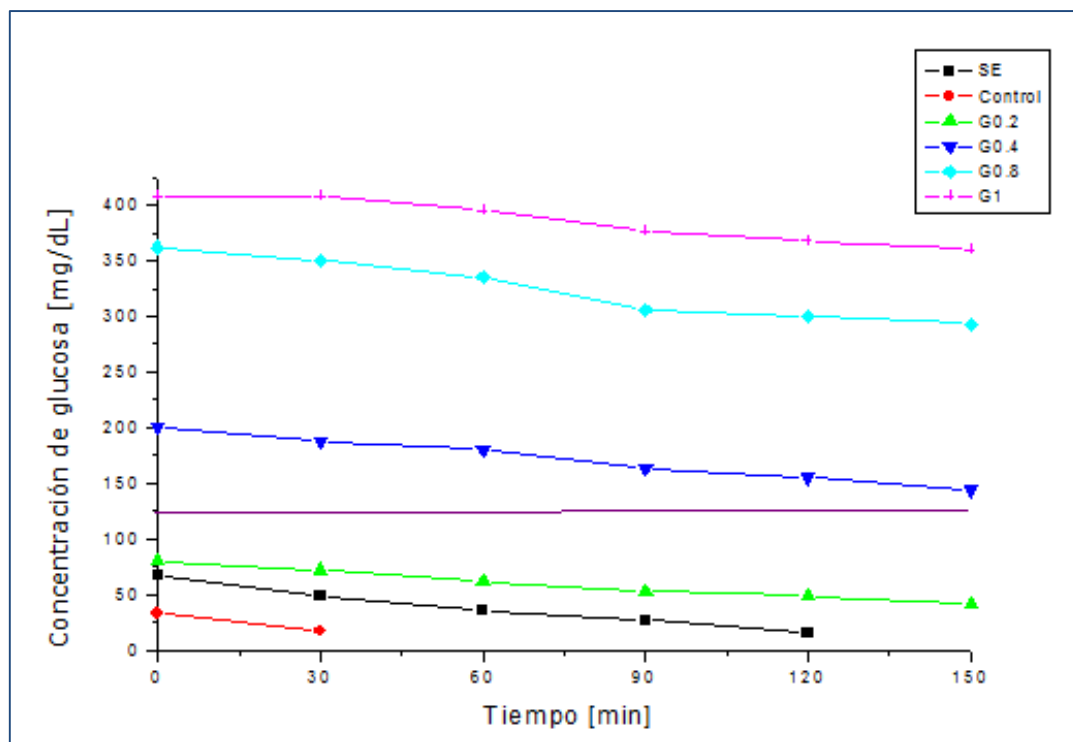


Figura 3.11: Concentración de glucosa en función del tiempo de incubación. La línea horizontal representa el valor de glucosa máximo normal (120 mg/dL).

En la Figura 3.11 se observa que para todas las muestras de GR en proceso de glicación, la concentración de glucosa en el medio disminuye en función del tiempo de incubación. En particular, para la incubación de GR con solución de glucosa 0,4 g/dL se observa que dicha disminución se mantiene sobre el nivel de los 140 mg/dL durante las cuatro horas de incubación (Tabla 3.4), lo cual representaría el estado de hiperglicemia en pacientes diabéticos.

En la Figura 3.12 se presenta un gráfico de barras correspondiente a la diferencia entre los valores de glucosa en el instante inicial ($t=0$) y los correspondientes a los otros tiempos de incubación para cada concentración (Tabla 3.4). Se observa que en los primeros 90 minutos de incubación, la glucosa en el medio se redujo alrededor de 40 mg/dL en los ensayos realizados. Esta reducción se incrementó en todos los ensayos con el transcurso del tiempo de incubación. Este valor correspondería a la cantidad de glucosa utilizada por los glóbulos rojos en su metabolismo más la cantidad de glucosa ligada a su superficie. Para los tiempos de incubación superiores a las 4 h, el comportamiento fue irregular (resultados no mostrados), por lo cual **se eligió el tiempo máximo de incubación de 3 h para el protocolo de la modelización *in vitro*.**

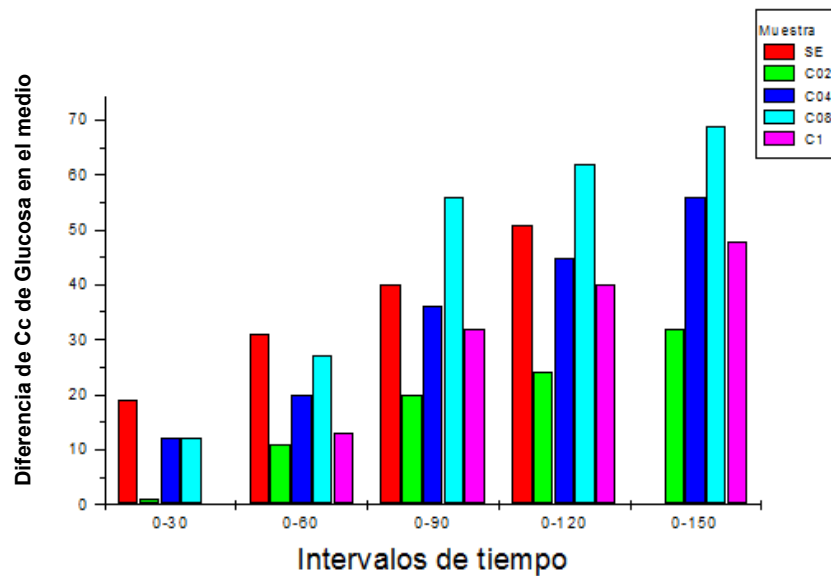


Figura 3.12: Gráfico de barras mostrando las diferencias entre los valores de glucosa en el medio en el instante inicial ($t=0$) y los correspondientes a los otros tiempos de incubación para cada concentración de glucosa (Tabla 3.4).

Condiciones óptimas para el proceso de glicación *in vitro* de GR

Teniendo en cuenta la variación en los resultados de los parámetros viscoelásticos en régimen estacionario y dinámico, los parámetros de agregación eritrocitaria y las imágenes digitales obtenidas con diferentes concentraciones de glucosa, se observa que **la concentración de glucosa de 0,4 g/dL es óptima para la obtención de lo GRg y la posterior incubación con los fitoterápicos seleccionados en un tiempo máximo de 3 horas**. A partir de dicha concentración y en el tiempo de trabajo establecido se encuentran cambios significativos en los parámetros estudiados, los cuales podrían ser modificados por acción de los fitoterápicos. Igualmente, en función de la bibliografía consultada, se realizan estudios a diferentes concentraciones de glucosa con el fitoterápico **trigonelina**.

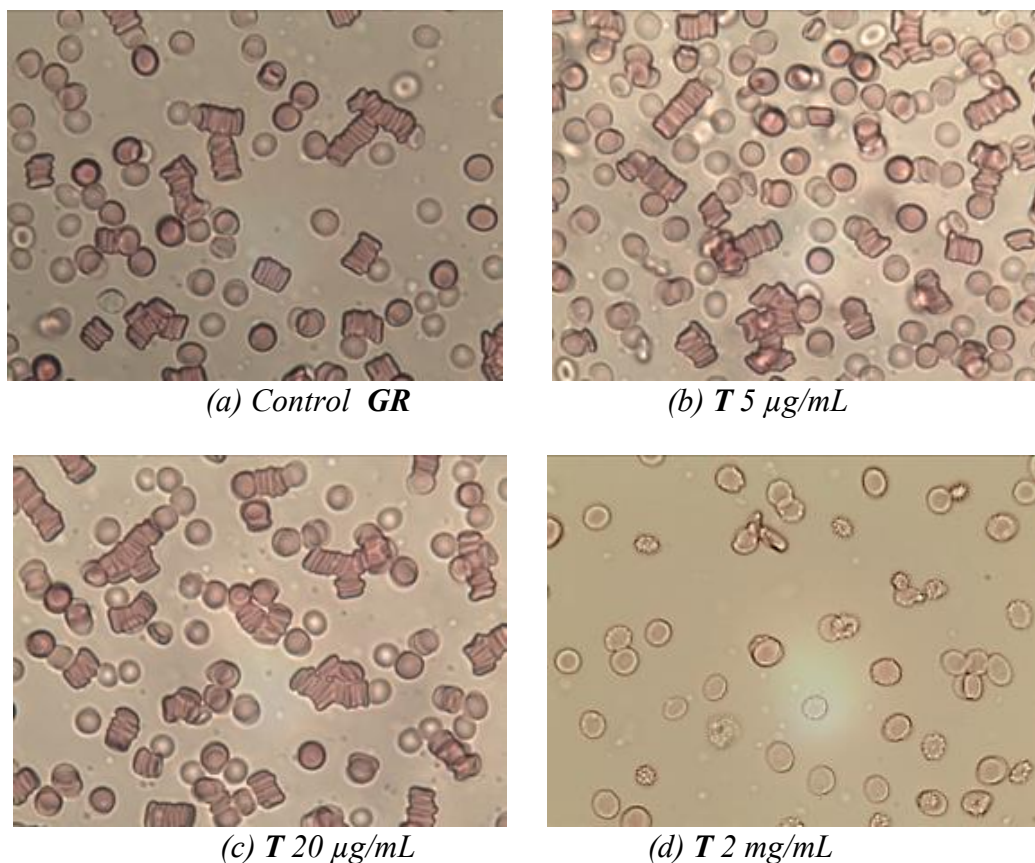
3.2.2 Trigonelina

Evaluación de la hemocompatibilidad de trigonelina para la optimización de la incubación

A fin de evaluar la acción de T sobre la morfología eritrocitaria, los GR se incubaron con soluciones de T a concentraciones desde 5 $\mu\text{g/mL}$ hasta 2 mg/mL . Una vez cumplido el

tiempo de incubación de 3 horas (2 horas de incubación con la solución de glucosa más 1 hora de incubación con las soluciones de **T**), los GR fueron lavados y resuspendidos al 0,3 % en plasma autólogo (Apéndice C-1).

Las muestras obtenidas fueron observadas utilizando un microscopio óptico invertido acoplado a una cámara digital, obteniendo imágenes por quintuplicado. En la Figura 3.13 se muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas para cada muestra.



*Figura 3.13: Ejemplo de las imágenes obtenidas para la evaluación de las alteraciones en la morfología eritrocitaria por la actividad de **T** a algunas de las concentraciones ensayadas. Microscopio Óptico 40x.*

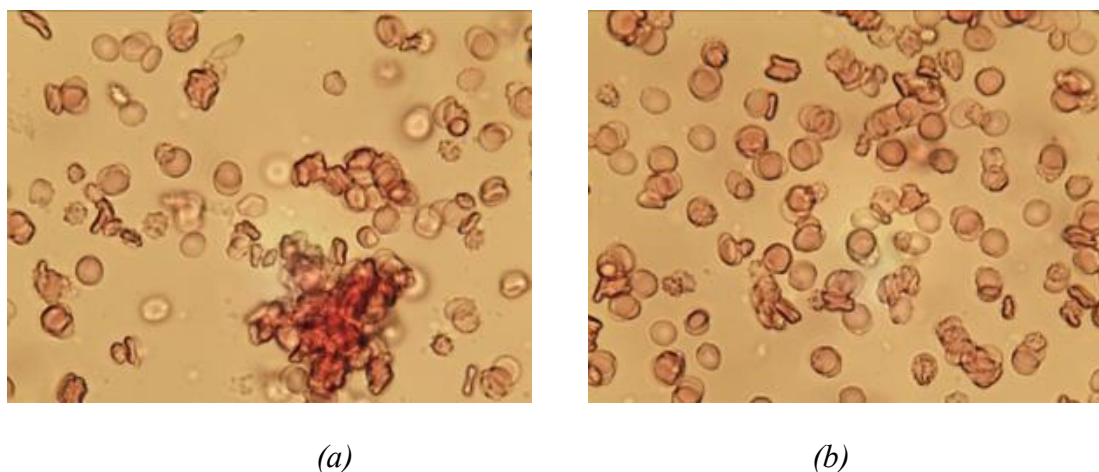
Al incubar los GR con concentraciones crecientes de **T** se observa la presencia de *rouleaux* de mayor tamaño (Figura 3.13 b) que las observadas en el control. A mayores concentraciones de **T**, los agregados se agrupan tomando formas globulares como se muestra en la Figura 3.13 c. Para la concentración de 2 mg/mL (Figura 3.13d) se observa la presencia de GR espiculados (equinocitos).

Mediante el análisis digital de las imágenes se calcularon los porcentajes de células equinocitadas en cada una, resultando ser: de (40 ± 2) % para las concentraciones de **T**

de 0,5 mg/mL y 2 mg/mL, siendo despreciable (inferior al 2%) para la concentración de 0,25 mg/mL. Para la concentración de 1 mg/mL no se observó la presencia de agregados eritrocitarios, lo cual sugiere que a esta concentración se inhibiría la agregación, siendo necesario estudios específicos para confirmarlo.

Evaluación de la actividad de trigonelina en los glóbulos rojos glicosados

Teniendo en cuenta los resultados de hemocompatibilidad se decidió utilizar una solución de **trigonelina** en PBS de concentración menor o igual a 1 mg/mL, ya que para concentraciones mayores se observó una cantidad significativa de GR equinocitados. Las soluciones para la incubación de **GRg** con el fitoquímico se prepararon según el Apéndice A-4 y el Apéndice B-5. La glicación de GR se realizó con la solución de glucosa de concentración 0,4 g/dL (**GRg0,4**) y con la concentración 1 g/dL (**GRg1**).

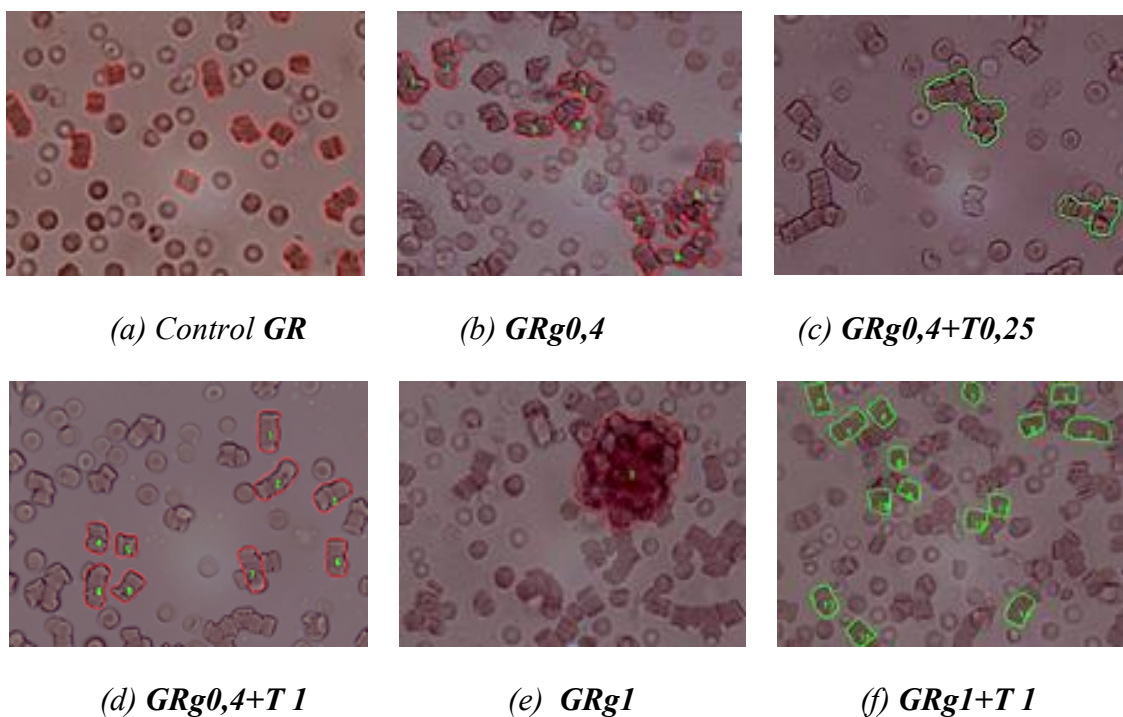


*Figura 3.14: Ejemplo de las imágenes obtenidas para los **GRg0,4** (a) y **GRg0,4+T1**(b) Microscopio Óptico con objetivo 40x correspondientes a 6 muestras por quintuplicado.*

En la Figura 3.14 se presenta un ejemplo de las imágenes obtenidas por quintuplicado para los **GRg0,4** (Figura 3.15a) y los mismos tratados con la solución de **T** a la concentración 1mg/mL (**GRg0,4+T1**). En la Figura 3.14b se observa una disminución del tamaño de los agregados eritrocitarios con el consecuente aumento del número de células aisladas.

Análisis digital de imágenes

A partir de las imágenes obtenidas se calcularon el C_{CA} y el ASP utilizando el Programa Image J. En las imágenes de la Figura 3.15 se observa que los agregados globulares se incrementan con la concentración de glucosa en el medio, y decrecen con el agregado de **T0,25** y **T1**, presentando un gran número de células aisladas y *rouleaux*.



*Figura 3.15: Ejemplo de las imágenes de GR glicosados con soluciones de glucosa 0,4 y 1 g/dL, y tratados con soluciones de **trigonelina** 0,25 y 1mg/mL. Imágenes obtenidas en 6 muestras por quintuplicado con Microscopio Óptico y objetivo 40x.*

La Tabla 3.5 muestra que el ASP y el C_{CA} se incrementan con el aumento de la concentración de glucosa, observándose la formación de agregados globulares. Estos parámetros tienden a los valores del control con el agregado de la solución de **trigonelina**.

Tabla 3.5: Parámetros ASP y C_{CA} obtenidos por análisis digital de imágenes. Valor medio \pm desvío standard obtenido para 6 muestras medidas por quintuplicado.

Muestra	ASP	C_{CA}
Control	0,64 \pm 0,06	0
GR+T0,25	0,68 \pm 0,03	0,06 \pm 0,03*
GR+T1	0,69 \pm 0,04	0,08 \pm 0,06*
G0,4	0,80 \pm 0,07*	0,75 \pm 0,06*
G1	0,89 \pm 0,09*	0,67 \pm 0,09*
G0,4+T0,25	0,75 \pm 0,06	0,53 \pm 0,08*^
G0,4+T1	0,61 \pm 0,06^	0,16 \pm 0,01*^
G1+T0,25	0,78 \pm 0,07*	0,53 \pm 0,03* ^o
G1+T1	0,75 \pm 0,07	0,56 \pm 0,02*

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01 con respecto a **GR**

^p-valor < 0,05; con respecto a **GRg0,4**

^op-valor < 0,05; con respecto a **GRg1**

La Figura 3.16 muestra un gráfico de cajas donde se observa el aumento del % CA en las muestras de **GRg0,4**, que aumenta con el agregado de **T0,25**, siendo la diferencia mayor con **T1** acercándose al valor control ($p < 0.01$).

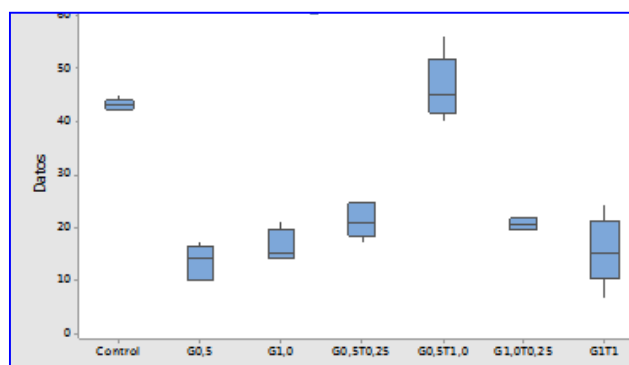


Figura 3.16: Gráfico de cajas del Porcentaje de células aisladas para las muestras **GRg0,4** y **GRg1**, tratadas con **T0,25** y **T1**. Las muestras fueron medidas por quintuplicado, $p < 0,01$.

Viscoelasticidad eritrocitaria

La Tabla 3.6 muestra los valores medios \pm los desvíos estándares con los correspondientes valor p de los parámetros viscoelásticos estacionarios de los **GR** y **GRg0,4** tratados con **T0,25** y **T1** obtenidos con el Reómetro Eritrocitario.

Tabla 3.6: Parámetros viscoelásticos estacionarios de los GR y GRg0,4 tratados con T. Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras obtenidas por quintuplicado.

Muestras	ID	μ [10⁻⁶ N/m]	η [10⁻⁷ N.s/m]
GR	0,62 \pm 0,01	5,22 \pm 0,08	2,27 \pm 0,04
GR+T0,25	0,64 \pm 0,01*	4,89 \pm 0,09*	2,09 \pm 0,9*
GR+T1	0,62 \pm 0,04	7,86 \pm 0,06***	2,31 \pm 0,46
GRg0,4	0,62 \pm 0,03	5,08 \pm 0,01*	2,10 \pm 0,10*
GRg0,4+T0,25	0,69 \pm 0,04*	6,7 \pm 0,4*^^	2,2 \pm 0,4
GRg0,4+T1	0,60 \pm 0,02	5,18 \pm 0,04^	2,9 \pm 0,1*^^

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001 con respecto a **GR**

^p-valor < 0,05; ^^p-valor < 0,01

Al incubar los **GR** lavados con las soluciones de **T** se observan cambios significativos con **T0,25** en los tres parámetros viscoelásticos: ID, μ y η respecto del control. El módulo elástico μ aumenta significativamente en la muestra **GR+T1**, indicando la posible actividad de T sobre la membrana eritrocitaria. Las muestras de **GRg0,4** muestran disminución de μ y η respecto del control (**GR**), y al analizar la actividad de T sobre estas muestras glicadas se observa un aumento en estos parámetros con **T0,25** y **T1** respecto de **GRg0,4**. Con **T1** μ tiende a su valor normal (**GR**), mientras que se observa un aumento significativo para η . También se observan diferencias significativas en los parámetros μ y η entre ambas muestras, **GRg0,4+T0,25** y **GRg0,4+T1**, lo cual sugeriría una diferencia en la actividad de T al aumentar su concentración sobre los **GRg0,4**.

La Tabla 3.7 muestra el desfase entre la tensión de corte y la respuesta de los **GR** y de los **GRg0,4** tratados con **Trigonelina** para tensiones de corte oscilantes con frecuencias 0,5; 1 y 1,5 Hz. Se observan aumentos significativas en δ en las muestras de **GRg0,4** respecto del control para las tres frecuencias. Ante el agregado de T a las muestras glicadas se ve una disminución significativa en $\delta_{1 \text{ Hz}}$ y $\delta_{1,5 \text{ Hz}}$, que tiende a los valores normales, dado que no muestran variaciones significativas.

Tabla 3.7: Desfase para los **GRg0,4** incubados con T 1 mg/mL. Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras medidas por quintuplicado.

Muestra	$\delta_{0,5 \text{ Hz}}$ [rad]	$\delta_{1 \text{ Hz}}$ [rad]	$\delta_{1,5 \text{ Hz}}$ [rad]
GR	0,22 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	1,12 \pm 0,01
GR+T1	0,32 \pm 0,01*	0,25 \pm 0,05	0,98 \pm 0,03*
GRg0,4	0,25 \pm 0,02*	0,37 \pm 0,01*	1,15 \pm 0,01*
GRg0,4+T1	0,18 \pm 0,02 [^]	0,20 \pm 0,06 [^]	0,98 \pm 0,07* [^]

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; respecto a **GR**

[^]p-valor < 0,05; ^{^^}p-valor < 0,01; respecto a **GRg0,4**

Cinética de Agregación eritrocitaria

En la Tabla 3.8 se muestran los valores obtenidos de los parámetros de cinética de agregación eritrocitaria obtenidos con el agregómetro de chip óptico.

Tabla 3.8: Parámetros de cinética de agregación eritrocitaria. Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras obtenidas por triplicado.

Muestra	Amp _{1/2}	t _{1/2} [s]	AI
GR	59 \pm 10	130 \pm 10	0,63 \pm 0,02
GRg1	78 \pm 10*	117 \pm 10	0,87 \pm 0,02*
GRg1+T0,25	69 \pm 10	128 \pm 10	0,66 \pm 0,03°
GRg1+T1	68 \pm 10	152 \pm 10***°°	0,62 \pm 0,02°
GRg0,4	76 \pm 10*	108 \pm 10	0,80 \pm 0,01*
GRg0,4+T1	64 \pm 10	146 \pm 10^^	0,65 \pm 0,02^
GRg0,4+T0,25	66 \pm 10	143 \pm 10^^	0,69 \pm 0,02^

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; respecto a **GR**

^p-valor < 0,05; ^^p-valor < 0,01; respecto a **GRg0,4**

°p-valor < 0,05; °°p-valor < 0,01; respecto a **GRg1**

En la Tabla 3.8 se observa un aumento significativo ($p < 0,01$) de la Amp_{1/2} para los **GRg0,4** y **GRg1** respecto del control **GR** y el consecuente aumento en IA. Para las muestras glicadas no se observan diferencias significativas en t_{1/2}. Sí se observa un aumento significativo en t_{1/2} al tratar las muestras glicadas **GRg0,4** con **T1** y con **T0,25**, y **GRg1** con **T1** superando el valor del control **GR**.

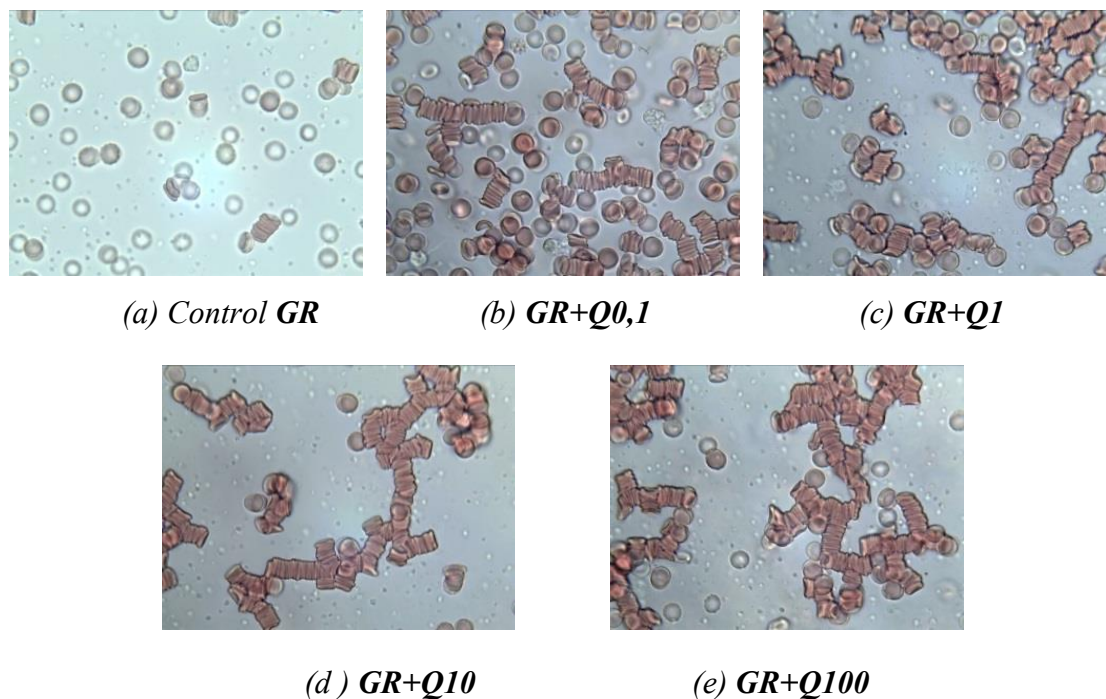
3.2.3 Quercetina

Se prepararon soluciones de **quercetina (Q)** adquirida de Laboratorio Sigma Aldrich, en PBS (solución buffer fosfato, pH 7 y osmolaridad 300 mOsm/L) a las concentraciones 0,1 μ M; 1,0 μ M; 10 μ M y 100 μ M, las cuales fueron elegidas de acuerdo a la información recopilada de la búsqueda bibliográfica (Thangasamy T. et al., 2009).

Realizados los ensayos de optimización, el tiempo total de incubación establecido fue de un máximo de 3 horas con agitación controlada a temperatura de 36,5° C, teniendo en cuenta las características lábiles de los flavonoides y su solubilidad en agua (Abraham H et al., 2014; Gonçalves V et al., 2015; Lévai G et al., 2015) (Apéndice A-5).

Análisis digital de imágenes

Las imágenes obtenidas por quintuplicado mediante Microscopía Óptica de 10 muestras demuestran cualitativamente la actividad de **Q** sobre **GR** (Figura 3.17):



*Figura 3.17: Ejemplo de las imágenes obtenidas por Microscopía Óptica de los GR tratados con **quercetina**: (a) Control, (b) 0,1 μ M; (c) 1,0 μ M; (d) 10 μ M y (e) 100 μ M 40X.*

En las imágenes obtenidas (Fig. 3.17) observamos que al aumentar la concentración de **Q** se favorece la formación de agregados globulares, aumentando su tamaño y perdiendo la forma de *rouleaux*.

Para minimizar los errores del análisis digital de imágenes, evitar la necesidad de un operador experto, disminuir el tiempo que implica el análisis de cada muestra y eliminar la subjetividad de los resultados se desarrolló e implementó un nuevo método de análisis. Para ello, inicialmente se realizó una revisión del protocolo para la obtención del CCA mediante el Análisis Digital de Imágenes, aplicando el programa Image J versión 2.9.0 (2020). En la Figura 3.18 se muestran las imágenes obtenidas en el proceso para el conteo de células aisladas.

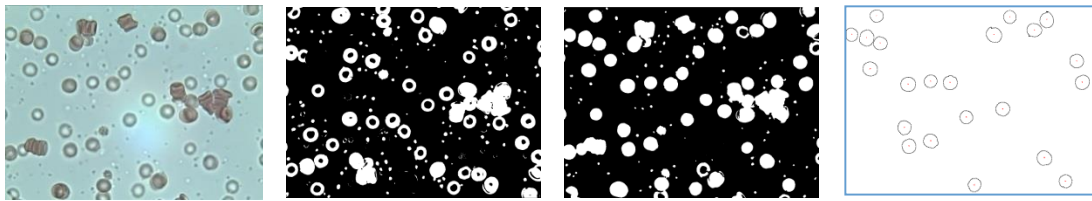


Figura 3.18: Ejemplo de las imágenes obtenidas mediante el programa Image J.

En esta sección se presentan los resultados a través del perfeccionamiento y optimización de la técnica de Análisis Digital de Imágenes, utilizando un software que brinda resultados más precisos, independientes de la subjetividad del operador, y en mucho menor tiempo de cálculo que el empleado en la técnica utilizada anteriormente.

Para ello se desarrolló una GUI (*Graphic User Interface*) en Python para sistematizar el análisis de imágenes digitales tomadas con una cámara acoplada a un microscopio invertido y objetivo 40x. El programa desarrollado permite aplicarles un balance de blancos para mejorar el contraste células-fondo y realizar el conteo de las células totales (incluidas aquellas que no se encuentran aisladas, sino formando rouleaux). Además, se diseñó una interfaz *on-click* para facilitar el manejo del programa a operarios no familiarizados con recursos informáticos. Los criterios de usabilidad de la GUI basada en la librería TkInter están dirigidos a usuarios no expertos. Los algoritmos de procesamiento de imágenes están contenidos en la biblioteca OpenCV2, que utiliza las redes neuronales previamente entrenadas por la empresa INTEL (<https://opencv.org/>).

Se utilizaron las imágenes correspondientes a glóbulos rojos de donantes sanos que fueron tratados con el fitoquímico **quercetina**. En la Figura 3.19 se muestra un ejemplo de una de las imágenes originales obtenidas para los GR incubados con **quercetina**.

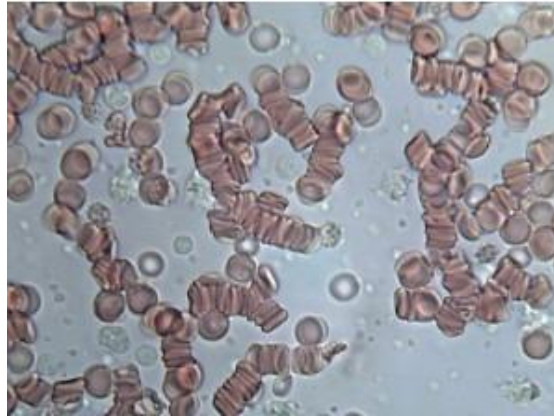


Figura 3.19 Imagen original de GR incubados con la solución de quercetina 100 μ M, obtenida con una cámara acoplada a un microscopio invertido y objetivo 40x.

La interfaz desarrollada permite utilizar imágenes digitalizadas de forma práctica e incluso remota. En la Figura 3.20 se muestra la misma imagen ecualizada por el programa usando la biblioteca “Python Imaging Library” (<https://python-pillow.org/>).

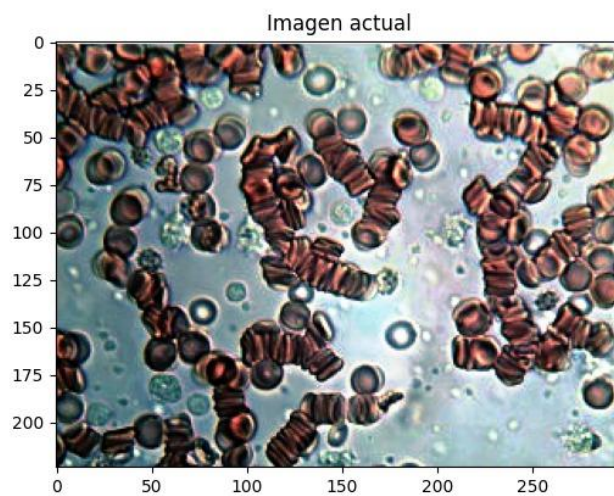


Figura 3.20: Imagen ecualizada por el programa usando la biblioteca “Python Imaging Library” (<https://python-pillow.org/>).

En la Fig. 3 se puede observar la imagen post conteo donde cada glóbulo rojo incluido en el conteo es indicado por el programa con su circunferencia teñida de azul..

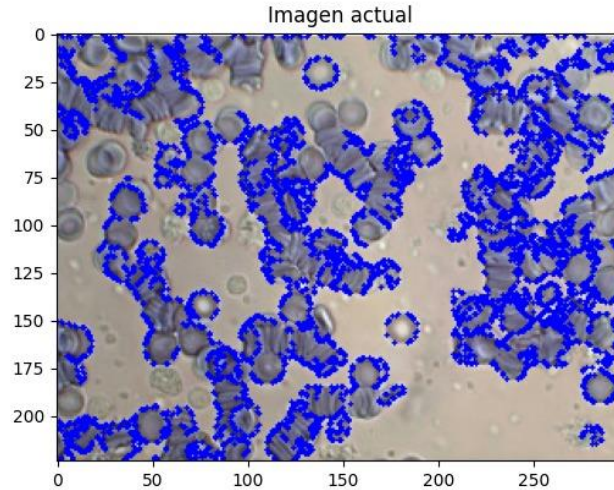


Figura 3.21: Imagen post conteo. Cada glóbulo rojo incluido en el conteo es indicado por el programa con su circunferencia teñida de azul.

La interfaz da el conteo y las relaciones del total de células con las células aisladas a través de un histograma, incluyendo las agrupadas en *rouleaux* o *clusters*. En la Figura 3.22 se presenta la visualización del resultado del conteo informado por el programa, el cual puede guardarse como un documento.



Figura 3.22. El resultado del conteo se informa en el programa y puede guardarse como un documento.

En la Figura 3.23 se observa a través del histograma emitido, el número y frecuencia de agregados eritrocitarios según la cantidad de células que los componen (Tamaño de *rouleaux*), en relación con las células aisladas.

El código desarrollado optimiza las imágenes en el caso de los *clusters* empleando un balance de blancos. El proceso asegura que el contraste entre la célula y el fondo sea tal que garantice una interpretación significativa del fenómeno de la agregación de eritrocitos.

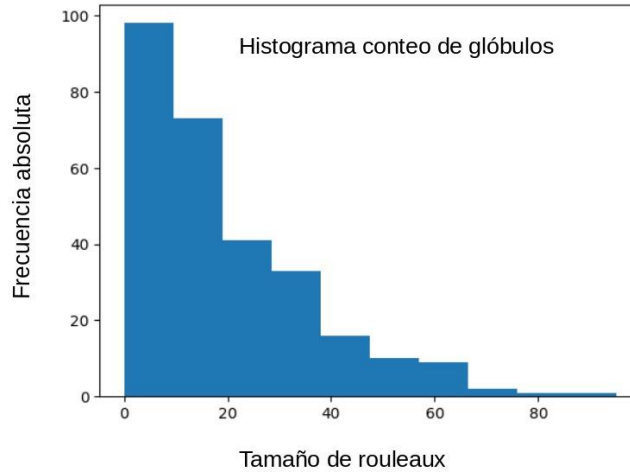


Figura 3.23. Histograma obtenido con la relación de CA y distintos grupos de agregados eritrocitarios

Con los valores obtenidos se calcula el coeficiente de células aisladas C_{CA} (Ecuación 2). En la Tabla 3.9 se presenta un ejemplo de los parámetros de agregación eritrocitaria (porcentaje de células aisladas CA y coeficiente de células aisladas C_{CA}) obtenidos a partir de las imágenes de las muestras de glóbulos rojos tratados con **quercetina**.

Tabla 3.9. Porcentaje de células aisladas y C_{CA} obtenidos de las muestras de glóbulos rojos control y tratados con distintas concentraciones de **quercetina**. Valor medio \pm desvío standard correspondientes a 10 muestras.

Muestra	CA	C_{CA}
GR	82,3 \pm 1,3	0
Q0,1	72,5 \pm 3,6***	0,120 \pm 0,006
Q1	56,4 \pm 2,8***	0,31 \pm 0,02*
Q10	55,6 \pm 2,8***	0,33 \pm 0,02*
Q100	37,6 \pm 1,9***	0,54 \pm 0,03*

* p -valor $<$ 0,05; ** p -valor $<$ 0,01; *** p -valor $<$ 0,001

En la Tabla 3.9, la disminución del CA y el aumento de C_{CA} muestran que a mayores concentraciones de quercetina se forman agregados de mayor tamaño, es decir

conformados por una mayor cantidad de células. Además no existen diferencias significativas entre las soluciones **Q1** y **Q100**. En base a estos resultados teniendo en cuenta las utilizadas en diversos estudios de investigación ya mencionados, y su solubilidad en agua (a concentraciones superiores a 100 μM es poco soluble en agua), se eligen las concentraciones de **quercetina** 10 y 100 μM (**Q10** y **Q100**) para realizar las pruebas hemorreológicas según el modelo de hiperglicemia *in vitro*. Las muestras de GR glicosados se incubaron con las soluciones de **Q** en las distintas concentraciones (Apéndice B-6) para realizar el análisis digital de imágenes y las mediciones con Agregómetro de chip óptico y Reómetro eritrocitario.

En la Tabla 3.10 se muestran los resultados de CA y C_{CA} obtenidos por análisis digital de imágenes, donde se observa una disminución significativa de CA en todas las muestras tratadas (**GR+Q10**, **GR+Q100**, **GRg**, **GRg+Q10** y **GRg+Q100**) respecto al control **GR**. Luego, CA aumenta significativamente en **GRg+Q10** y **GRg+Q100**, tendiendo a los valores del control, evidenciándose el efecto antiagregante de **Q** sobre los glóbulos rojos glicosados.

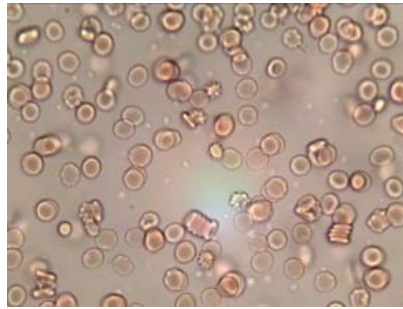
*Tabla 3.10. Porcentaje de células aisladas y C_{CA} obtenidos de las muestras **GR** y **GRg** y tratados con distintas concentraciones de **quercetina**. Valor medio \pm desvío standard correspondientes a 10 muestras.*

Muestra	CA	C_{CA}
GR	82,3 \pm 1,1	0
Q10	55,6 \pm 2,8*	0,33 \pm 0,02*
Q100	37,7 \pm 1,9*	0,54 \pm 0,03*
GRg0,4	20,6 \pm 1,3*	0,75 \pm 0,06**
GRg+Q10	46,1 \pm 2,1* [^]	0,44 \pm 0,03*
GRg+Q100	68,5 \pm 1,5* [^]	0,17 \pm 0,03** [^]

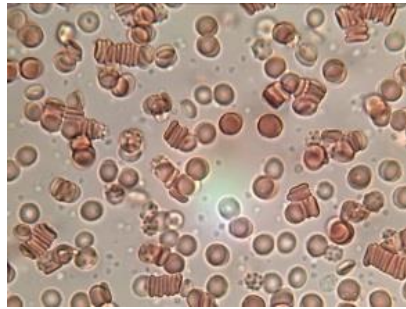
*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01 con respecto a **GR**

[^]p-valor < 0,05; con respecto a **GRg0,4**

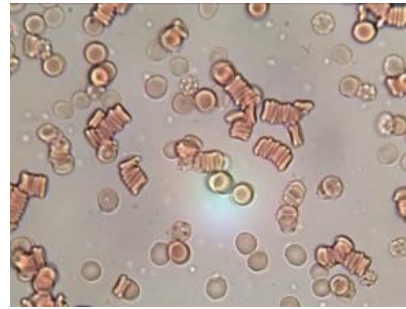
En la Figura 3.24 se muestra una imagen de ejemplo de las muestras de **GR** y **GRg** incubados con **Q10** y **Q100** y los controles respectivos (**GR** y **GRg0,4**).



(a) **GR**



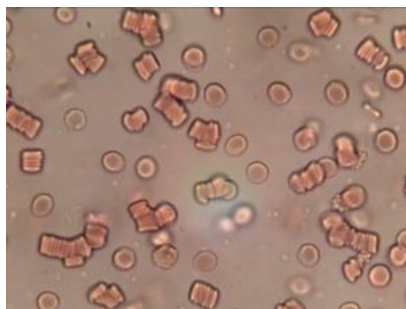
(b) **GR+Q10**



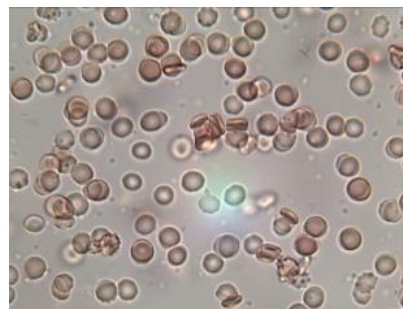
(c) **GR+Q100**



(d) **GRg0,4**



(e) **GRg0,4+Q10**



(f) **GRg0,4+Q100**

Figura 3.24: Ejemplo de las imágenes obtenidas por microscopía óptica de los **GRg0,4** tratados con las concentraciones de **quercetina** 10 μM y 100 μM.

Viscoelasticidad eritrocitaria

En la Tabla 3.11 se presentan los resultados de los parámetros viscoelásticos de **GR** y **GRg0,4** tratados con **quercetina** 10 μ M y 100 μ M (**Q10** y **Q100**), con sus valores medios \pm los desvíos estándares y los correspondientes valores p.

Tabla 3.11: Parámetros viscoelásticos de **GR** y **GRg0,4** tratados con **Quercetina**. Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras medidas por quintuplicado.

Muestras	ID	μ [10 ⁻⁶ N/m]	η_m [10 ⁻⁷ N.s/m]
GR	0,62 \pm 0,01	5,22 \pm 0,08	2,27 \pm 0,04
GR+Q10	0,61 \pm 0,01	5,08 \pm 0,08	2,45 \pm 0,21
GR+Q100	0,62 \pm 0,01	5,07 \pm 0,09	2,30 \pm 0,10
GRg0,4	0,62 \pm 0,03	5,08 \pm 0,01*	2,10 \pm 0,03*
GRg0,4+Q10	0,63 \pm 0,01	5,09 \pm 0,04*	2,20 \pm 0,01^^
GRg0,4+Q100	0,61 \pm 0,01	5,05 \pm 0,01*^	2,35 \pm 0,03^^

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; respecto a **GR**

^p-valor < 0,05; ^^p-valor < 0,01; respecto a **GRg0,4**

En la Tabla 3.11 no se observan diferencias significativas en los parámetros ID; con respecto a μ todas las muestras presentan una disminución significativa respecto al control **GR** a excepción de la muestra **GRg+Q10** y **GRg+Q100**. Solo **GRg+Q100** presenta una pequeña disminución con respecto al control glicado ($p < 0,05$). Se observan diferencias significativas en η solamente en **GRg0,4** respecto al control **GR**. Las muestras **GR** tratadas con **Q10** y **Q100** no muestran diferencias significativas con el control, lo que demuestra la hemocompatibilidad del fitoterápico a ambas concentraciones. Sin embargo al tratar las muestras **GRg0,4** con **Q10** y **Q100**, se observan diferencias significativas con el control glicado. Los valores de los parámetros de **GRg0,4+Q10** y **GRg0,4+Q100** se acercan a los del control **GR**, lo cual sugiere que la actividad de **Q** podría revertir las alteraciones en los eritrocitos debida a la glicación.

A partir de las curvas obtenidas en régimen oscilatorio se determinó el desfase δ entre la respuesta de los eritrocitos y la tensión de corte aplicada. El $\delta_{1.5 \text{ Hz}}$ mostró un aumento

significativo para las muestras **GR+Q100**, **GRg0,4** y **GRg+Q100** respecto del control. Para las frecuencias de 0,5 y 1 Hz no se observaron cambios significativos respecto al control, excepto la muestra **GRg+Q100** a 0,05 Hz. En el caso de la frecuencia de 1 Hz no se observaron diferencias significativas respecto de los controles en ninguna de las muestras. Este parámetro permite calcular las componentes de la viscoelasticidad dinámica de los eritrocitos (G') para las tres frecuencias, el cual representa el módulo de almacenamiento. G' muestra un aumento significativo en **GRg+Q100** respecto del control GR para 0,5 y 1,5 Hz (Tabla 3.12).

Tabla 3.12: Parámetros de viscoelasticidad dinámica de GR y GRg0,4 tratados con Q10 y Q100. Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras medidas por quintuplicado.

MUESTRA	$G'_{0.5 \text{ Hz}}$ [10^{-6} N/m]	$G'_{1.0 \text{ Hz}}$ [10^{-6} N/m]	$G'_{1.5 \text{ Hz}}$ [10^{-6} N/m]
GR	4,8 \pm 0,1	4,38 \pm 0,06	1,28 \pm 0,4
GR+Q10	4,8 \pm 0,2	4,42 \pm 0,15	1,20 \pm 0,30
GR+Q100	4,81 \pm 0,05	4,34 \pm 0,08	1,42 \pm 0,02*
GRg0,4	4,8 \pm 0,1	4,38 \pm 0,05	1,39 \pm 0,04*
GRg+Q10	4,8 \pm 0,1	4,45 \pm 0,10	1,33 \pm 0,02
GRg+Q100	5,03 \pm 0,01**^	4,33 \pm 0,08	1,58 \pm 0,02**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto a **GR**; ^ p -valor $< 0,05$ respecto a **GRg0,4**

En la Tabla 3.13 se observan los cambios más relevantes para las muestras tratadas a la frecuencia de 0,5 Hz (situación que puede ser evidenciada en pacientes con pulsación menor a 80 p/min), en las que se aprecia una disminución significativa de la Pérdida Dinámica para **GRgQ100** y se ve aumentada para la frecuencia de 1 Hz (situación evidenciada en pacientes con pulsación normal)

Tabla 3.13: Parámetros pérdida dinámica de **GR** y **GRg0,4** tratados con **quercetina**.

Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras.

MUESTRA	$G''_{0.5 \text{ Hz}}$ [10 ⁻⁶ N/m]	$G''_{1.0 \text{ Hz}}$ [10 ⁻⁶ N/m]	$G''_{1.5 \text{ Hz}}$ [10 ⁻⁶ N/m]
GR	1,38 \pm 0,03	2,47 \pm 0,04	4,85 \pm 0,05
GR+Q10	2,31 \pm 0,09	2,36 \pm 0,08	4,86 \pm 0,08
GR+Q100	1,47 \pm 0,20	2,53 \pm 0,04	4,82 \pm 0,07
GRg0,4	1,20 \pm 0,05*	2,46 \pm 0,09	4,82 \pm 0,10
GRg0,4+Q10	1,60 \pm 0,03**^	2,43 \pm 0,08	4,90 \pm 0,06
GRg0,4+Q100	0,79 \pm 0,05**^	2,65 \pm 0,09**	4,82 \pm 0,06

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; respecto a **GR**
^p-valor < 0,05; ^^p-valor < 0,01; respecto a **GRg0,4**

Cinética de agregación eritrocitaria

En la Tabla 3.14 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros tiempo mitad ($t_{1/2}$), Amplitud (Amp) e Índice de Agregación (IA) en las muestras **GR** y **GRg**, y tratadas con Q10 y Q100 con Agregómetro de Chip Óptico en 400 segundos.

Tabla 3.14: Parámetros de cinética de agregación eritrocitaria. Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras por triplicado.

Muestra	Amp _{1/2}	t _{1/2} [s]	IA
GR	59 \pm 10	130 \pm 10	0,63 \pm 0,02
GR+Q10	96 \pm 5*	79 \pm 5**	0,88 \pm 0,01*
GR+Q100	87 \pm 5*	62 \pm 5**	0,86 \pm 0,02*
GRg0,4^	76 \pm 10*	108 \pm 10*	0,80 \pm 0,01*
GRg0,4+Q10	69 \pm 5	118 \pm 5**	0,67 \pm 0,01*^^
GRg0,4+Q100	58 \pm 5^	127 \pm 5^	0,75 \pm 0,02**^

*p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01; respecto a **GR**
^p-valor < 0,05; ^^p-valor < 0,01; respecto a **GRg0,4**

En la Tabla 3.14 se observa que al tratar los GR con Q10 y Q100 el $t_{1/2}$ de agregación disminuye, Amp e IA aumentan, lo cual demuestra aumento en la formación y cantidad de agregados eritrocitarios con el consecuente aumento de Amp y el IA. Al tratar las muestras glicadas con **Q10** y **Q100** $t_{1/2}$ de Agregación, Amp e IA tienden a sus valores normales (**GR**) aunque siguen siendo diferencias significativas.

3.2.4 β -sitosterol

Estudios preliminares con el fitoterápico β -sitosterol

Primeramente, se realizó la búsqueda bibliográfica para confeccionar un protocolo adecuado para la elaboración de la solución con el compuesto **β -sitosterol (BS)** y sus características generales: peso molecular, solubilidad, y concentraciones utilizadas en otros ensayos de investigación (Martínez Aguilar Y et al, 2011, Haiyuan Y et al., 2019; Sharma P et al., 2019; Feng S et al., 2018; Iweala E. et al., 2024; Weeratanakorn M et al., 2024). En general se utilizan concentraciones del compuesto desde 0,5 hasta 80 μM y aún mayores. Además, emplean de preferencia el compuesto isopropanol como disolvente, el cual es utilizado en Farmacia para la preparación de soluciones antisépticas y detergentes, por lo cual no sería de utilidad para utilizar con muestras de **GR**.

Luego, se realizaron los siguientes estudios preliminares:

- Prueba de Solubilidad en PBS y alcohol bencílico (disolvente utilizado para la reconstitución de medicamentos para vía endovenosa en la Clínica Médica).
- Incubación de glóbulos rojos **GR** y **GRg0,4** con las soluciones de **BS**.

*Soluciones de **BS** utilizadas en los ensayos preliminares*

Se prepararon dos tipos de soluciones de **β - Sitosterol** (Sigma Aldrich, de 95 % pureza) con distinto disolvente tal como se describe en el Apéndice A-6:

- Solución **BSPBS**: **β -sitosterol** en **PBS** a 40 μM .
- Solución **BSSO**: **β -sitosterol** en solvente orgánico (**SO**) a 40 μM . Este disolvente consistió en alcohol bencílico en aguaⁱⁱ utilizando la presentación comercial de 71 mg/agua, en ampollas de 8 mL.

La concentración de **BS** de 40 μM utilizada previamente para la incubación con los GR fue seleccionada teniendo en cuenta la bibliografía revisada (Martínez Aguilar Y et al, 2011, Haiyuan Y et al., 2019; Sharma P et al., 2019; Feng S et al., 2018; Iweala

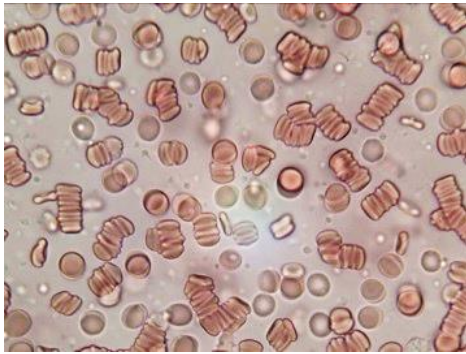
ⁱⁱ El alcohol bencílico en agua se utiliza en Clínica Médica como disolvente de fármacos de uso parenteral, como por ejemplo la Metilprednisolona, un corticoide presentado en la forma farmacéutica de ampollas.

E. et al., 2024; Weeratanakorn M et al., 2024).).Se utilizó la solución de glucosa de 0,4 g/dL para la incubación con los GR lavados descrita en el Apéndice B-7 obteniendo los **GRg0,4**.

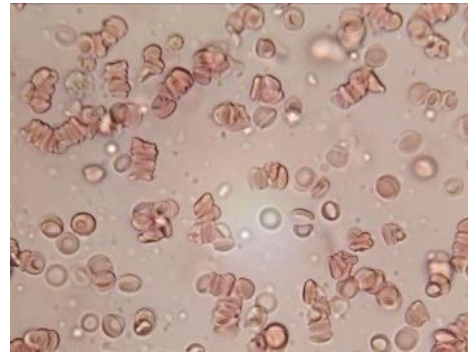
Análisis digital de imágenes

Una vez incubados los **GR** y **GRg0,4** con las distintas soluciones, se procedió a preparar las muestras para la obtención de las imágenes microscópicas para su análisis y determinación de los parámetros de agregación CA y C_{CA}.

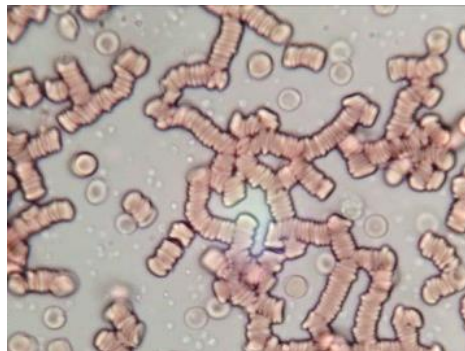
En la Figura 3.25 se presenta un ejemplo de las imágenes obtenidas de los **GR** y **GRg0,4** tratados con las soluciones de **β-sitosterol** en PBS y en solvente orgánico (**SO**). En estas fotografías se observa que en la muestra de **GR+SO**, los eritrocitos son levemente de menor tamaño que los de la muestra control de **GR+PBS**. Al incubar los **GRg0,4** con **BSPBS** se observa una disminución de la agregación eritrocitaria. En cambio, en la muestra de **GRg0,4** tratada con la solución **BSSO** se observa una marcada disminución del tamaño de los eritrocitos, aunque no se observan eritrocitos crenados ni equinocitados.



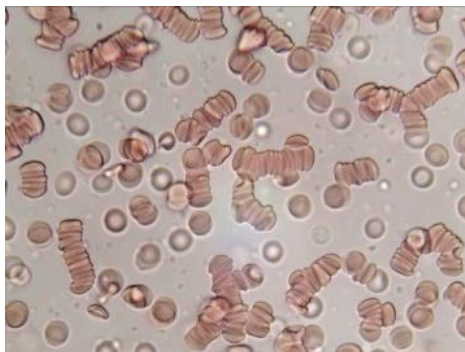
GR+PBS



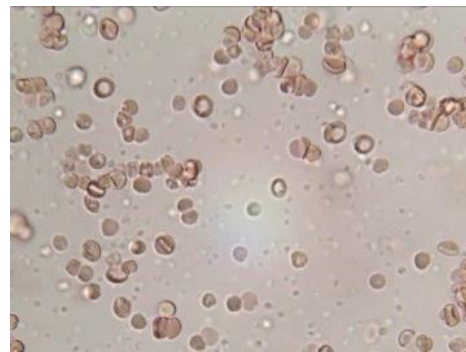
GR+SO



GRg0,4



GRg0,4+BSPBS



GRg0,4+BSSO

*Figura 3.25: Ejemplo de las imágenes obtenidas por microscopía óptica de los **GR** y **GRg0,4** tratados con las soluciones de β -sitosterol en **PBS** y en solvente orgánico (**SO**).
Objetivo 40x correspondientes a 10 muestras por quintuplicado.*

Selección de las concentraciones y medios de disolución para le BS

En las muestras de **GRg0,4** tratadas con la solución **BSPBS** se observa una disminución de la agregación eritrocitaria, pero dada la escasa solubilidad de **BS** en **PBS** no se conoce la concentración final del mismo para obtener tal efecto. Esta escasa solubilidad fue observada durante la preparación dado que contenía partículas en suspensión visibles a simple vista (la solución no era transparente).

Los resultados preliminares con el compuesto **BS** que es liposoluble y poco hidrosoluble, mostraron que se disuelve satisfactoriamente en alcohol bencílico, pero altera la morfología de los eritrocitos sin producir crenación de los mismos. Por lo tanto, para no alterar significativamente la morfología de los eritrocitos, se propone diluir el alcohol bencílico en **PBS** preparando una solución madre del fitoquímico en **SO** para luego utilizarla en forma diluida en **PBS** (EFSA Panel on Food Additives and Flavorings, 2019; IQB Medciclopedia, 2011). La preparación de esta solución, que se denomina **BS_d**, se encuentra detallada en el Apéndice A-6.

Parámetros viscoelásticos de la membrana eritrocitaria

En la Tabla 3.15 se presentan los resultados obtenidos con el Reómetro Eritrocitario de los parámetros viscoelásticos estacionarios de los **GR** y **GRg0,4** tratados con la solución **BS_d**.

Tabla 3.15: Parámetros viscoelásticos estacionarios de los GR y GRg0,4 tratados con la solución BS_d. Valor medio ± desvío estándar correspondiente a 10 muestras medidas por quintuplicado.

Muestras	ID	μ [10 ⁻⁶ N/m]	η [10 ⁻⁷ N.s/m]
GR	0,623 ± 0,008	5,22 ± 0,28	2,27 ± 0,14
GR+ BS_d	0,58 ± 0,04	5,06 ± 0,18	3,1 ± 0,01***
GRg0,4	0,62 ± 0,03	5,08 ± 0,10	2,10 ± 0,03
GRg,4+ BS_d	0,58 ± 0,04	5,06 ± 0,12	2,6 ± 0,4 [^]

**p-valor < 0,05; **p-valor < 0,001; respecto a GR
[^]p-valor < 0,05; [^]p-valor < 0,01; respecto a GRg0,4*

Los resultados de los parámetros viscoelásticos estacionarios de la Tabla 3.15 muestran un aumento significativo de la viscosidad superficial de membrana con el tratamiento de **BS_d** tanto en los **GR** como en los **GRg0,4**. Este resultado sugiere que la interacción de este compuesto disuelto en **SO** y diluido en **PBS** es con la bicapa lipídica de la membrana. Los valores de la viscoelasticidad dinámica correspondientes G'' y G' (resultados no presentados) no mostraron diferencias significativas para la frecuencia de 0,5 Hz, mientras que los correspondientes a las frecuencias 1 y 1,5 Hz estaban fuera de rango.

Esto pudo deberse a la presencia de células muy dañadas o microagregados, por lo cual estos resultados no fueron considerados en este estudio.

Cinética de agregación eritrocitaria

En la Tabla 3.16 se muestran los resultados obtenidos con el Agregómetro de Chip Óptico correspondientes a los parámetros de agregación eritrocitaria (Amp, IA y $t_{1/2}$).

Tabla 3.16: Parámetros de cinética de agregación eritrocitaria obtenidos con el Agregómetro de Chip Óptico para los GR y GRg0,4 tratados con BS_d. Valor medio \pm desvío standard correspondiente a 10 muestras medidas por triplicado.

Muestra	Amp	$t_{1/2}$ [s]	IA
GR	82 \pm 5	60 \pm 10	0,74 \pm 0,02
GR+BS_d	70 \pm 4*	89 \pm 4*	0,65 \pm 0,03*
GRg0,4	91 \pm 2*	45 \pm 6*	0,79 \pm 0,03
GRg0,4+ BS_d	79 \pm 2 [^]	72 \pm 5 [^]	0,72 \pm ,01 [^]

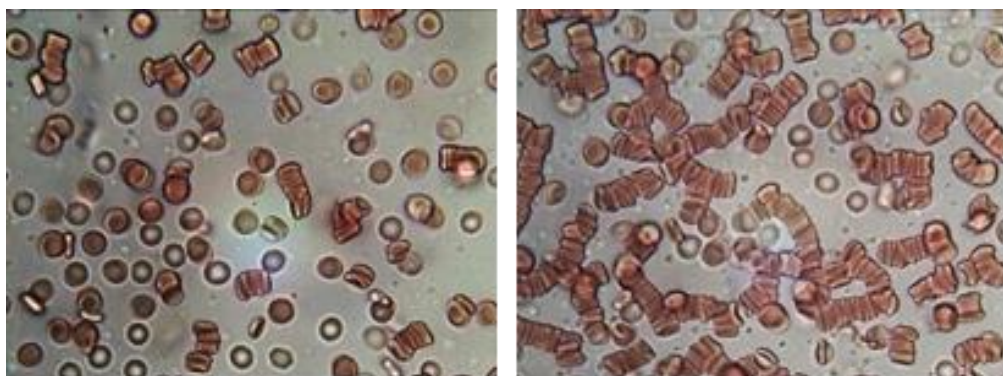
p*-valor < 0,05; respecto a **GR

[^]*p*-valor < 0,05; respecto a **GRg0,4**

Los resultados de la Tabla 3.16 muestran alteraciones significativas de los parámetros de cinética de agregación en las muestras **GR+BS_d** respecto al control **GR**, observándose una disminución en Amp y en IA, y un aumento en $t_{1/2}$. Además, en las muestras **GRg+BS_d** con respecto al control glicado **GRg0,4** se observa que los tres parámetros varían significativamente ($p < 0,05$), tendiendo a los valores del control **GR** sin glicar ($p > 0,05$). Estos resultados sugieren una interacción del **BS_d** con el glicocalix disminuyendo la agregación eritrocitaria con la consecuente reversión del efecto de la glicación.

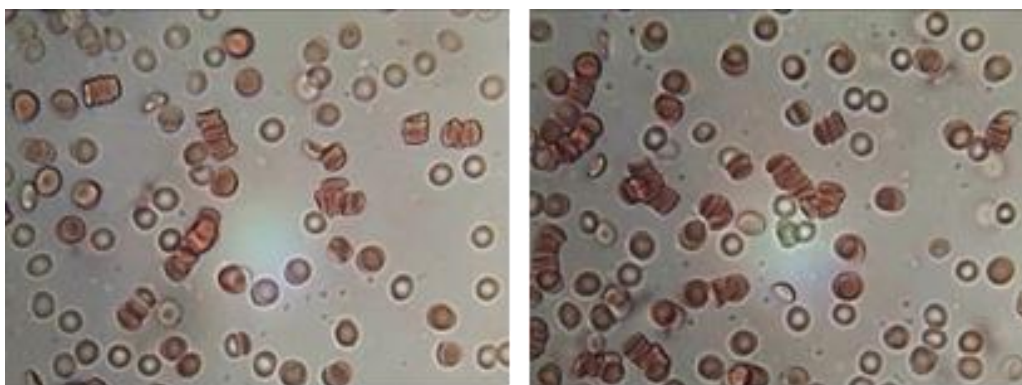
Parámetros de agregación eritrocitaria por Análisis Digital de Imágenes

En la Figura 3.26 se presenta un ejemplo de las imágenes obtenidas por microscopía óptica de los **GRg0,4** tratados con la solución de β -sitosterol en solvente orgánico diluido **GRg+BS_d**.



GR_d

GRgBS_d



GR+BS_d

GRg+BS_d

*Figura 3.26: Ejemplo de las imágenes obtenidas por microscopía óptica de los **GRg0,4** tratados con la solución de β -sitosterol en solvente orgánico diluido (**GRg+BS_d**).*

Imágenes tomadas en el microscopio invertido con objetivo 40x.

En la tabla 3.17 se muestran los resultados de los parámetros de agregación CA y C_{CA} obtenidos mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas por quintuplicado para las 10 muestras analizadas.

Tabla 3.17. Porcentaje de células aisladas y C_{CA} obtenidos de las muestras de los **GR** y **GRg0,4** tratados con **BS_d**. Valor medio \pm desvíos estándares correspondientes a 10 muestras por quintuplicado.

Muestra	CA %	C_{CA}
GR	50 ± 8	0
GR+BS_d	$72 \pm 3^{**\wedge}$	$- 0,44 \pm 0,07^{**\wedge}$
GRg	$16 \pm 3^{**}$	$0,7 \pm 0,1^{**}$
GRg+BS_d	$39 \pm 5^{*\wedge}$	$- 1,4 \pm 0,2^{**\wedge}$

* p -valor $< 0,05$; ** p -valor $< 0,01$ respecto a **GR**
 \wedge p -valor $< 0,05$; respecto a **GRg0,4**

Los resultados de la Tabla 3.17 muestran un incremento en los valores de CA y los valores de $C_{CA} < 0$, lo cual demostraría una actividad antiagregante de **BS_d** al actuar sobre **GR** y **GRg0,4**. Estos resultados concuerdan con los obtenidos de cinética de agregación en la Tabla 3.16.

4 – Discusión de los resultados y Conclusiones

4.1 Discusión y conclusiones particulares

4.1.1 Sobre el método de glicación *in vitro*

- El estudio de glucosa libre mediante el método de hemoglucotest con dispositivo marca Accu-Chek® brindó información sobre el fenómeno de glucólisis de los glóbulos rojos en el tiempo.
- El análisis digital de imágenes muestra la presencia de grandes agregados o *clusters* en los **GRg**, a diferencia de los *rouleaux* observados en los controles de glóbulos rojos lavados incubados con PBS (**GR**).
- Estudios preliminares demostraron que la concentración de glucosa 0,4 g/dL fue la adecuada a utilizar en el modelo de glicación *in vitro*, lo cual se fundamenta en las siguientes observaciones:
 - Se observó que al cabo de 4 horas las concentraciones iniciales de glucosa 0,1 g/dL, 0,2 g/dL, 0,4 g/dL, 1 g/dL y 2 g/dL disminuyeron significativamente.
 - Para las concentraciones $\geq 0,4$ g/dL la concentración de glucosa en el medio se mantuvo sobre el nivel de 140 mg/dL, lo cual representaría el estado de hiperglicemia en pacientes diabéticos.
 - El análisis de la viscoelasticidad de los **GRg** presenta alteraciones significativas con respecto al control **GR** de:
 - μ para las concentraciones $\geq 0,4$ g/dL
 - η para las concentraciones 0,1 g/dL, 0,2 g/dL y 1 g/dL
 - ID para las concentraciones 0,1 g/dL y 2 g/dL
 - El análisis de la viscoelasticidad de los **GRg** con la solución de glucosa al 0,4 g/dL presentó alteraciones significativas con respecto al control **GR** en todos los parámetros estudiados.
 - El parámetro δ de la viscoelasticidad dinámica para las tres frecuencias ensayadas (0,5 Hz; 1 Hz; 1,5 Hz) de los **GRg** presentó respecto del control **GR**:
 - un aumento significativo con la solución 0,4 g/dL

- una disminución significativa para las concentraciones de glucosa más altas (1 g/dL; 2 g/dL) se observa una disminución significativa.
- En el análisis sobre la cinética de agregación eritrocitaria se observa en comparación con el control **GR**:
 - para la muestra **GRg0,4** alteraciones significativas del $t_{1/2}$ y del IA ($p < 0,01$).
 - para todas las muestras glicadas (**GRg0,1; GRg0,2; GRg0,4; GRg1 y GRg2**) se observa que el IA aumenta significativamente al incrementarse la concentración de glucosa del medio respecto de la muestra control ($p < 0,05$), simulando las alteraciones de los glóbulos rojos en pacientes diabéticos (Foresto P, et al., 2000; Delannoy M, et al., 2015; Alet A, et al., 2016).

Estos estudios sugieren que el tratamiento con glucosa conduciría a una disminución de la repulsión electrostática entre las células, aumentando la agregación eritrocitaria de manera similar a lo observado en la diabetes por la hiperglucemia.

Por lo tanto, como fue observado (Sección 3.2.1), la concentración de 0,4 g/dL resultó ser la óptima para lograr una diferencia detectable de los parámetros hemorreológicos entre las muestras de control y las glicadas (Buszniez P, et al., 2017; Buszniez P, et al., 2019, Batista M et al.; 2020 Batista M, et al., 2022), similar a las que se encuentran en las muestras de pacientes diabéticos), indicando que el protocolo utilizado es adecuado para la modelización *in vitro* de la hiperglucemia en la diabetes.

4.1.2 Sobre el fitoquímico trigonelina

En la evaluación con soluciones de distintas concentraciones de **T** en los **GR** lavados se encontró que la concentración óptima de **T** debe ser menor o igual a 1 mg/mL.

En la Tabla 4.1 se presenta un resumen de los resultados más relevantes obtenidos para los **GR** y **GRg** tratados con las soluciones de **T** a las concentraciones 0,25 y 1 mg/mL.

Tabla 4.1: Síntesis de los resultados obtenidos para los **GR** y **GRg** tratados con las soluciones de **T** en comparación con los eritrocitos lavados sin tratar (**GR**).

Muestra	T mg/mL	Viscoelasticidad eritrocitaria						Agregación eritrocitaria			
		ID	μ	η	$\delta_{0,5}$	δ_1	$\delta_{1,5}$	ASP	CCA	IA	t _{1/2}
GR	0,25	↑	↓	↓				-	-	-	-
	1	-	↑	-	↑	-	↓	-	-	-	-
GRg0,4	0	-	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-
	0,25	↑	↑↑	-				-	↑↓	-↓	-↑
	1	-	-↑	↑↑	-↓	-↓	-↓	-↓	↑↓	-↓	-↑
GRg1	0							↑	↑	↑	-
	0,25							↑-	↑↓	-↓	-↑
	1							- -	↑-	-↓	↑↑

↓ disminución significativa con respecto a GR
 ↓ disminución significativa con respecto a GRg
 ↑ aumento significativo con respecto a GR
 ↑ aumento significativo con respecto a GRg
 - sin diferencia significativa con GR
 - sin diferencia significativa con GRg

Al analizar los resultados de la Tabla 4.1 se observa que:

- los parámetros de agregación eritrocitaria de los eritrocitos tratados con las soluciones **T0,25** y **T1** no presentan alteraciones significativas en los parámetros de agregación. Esto demuestra la hemocompatibilidad de la **trigonelina** a las concentraciones de 0,25 y 1 mg/mL, en lo que respecta a la agregación eritrocitaria.

- al tratar los eritrocitos glicosados con la solución de **T1**, los parámetros viscoelásticos tienden a los valores de los eritrocitos sin glicar (**GR**). Estos resultados sugieren que la solución de **trigonelina** de concentración 1 mg/mL recuperaría la viscoelasticidad de la membrana eritrocitaria que estaba alterada debido a la glicación.
- al tratar los eritrocitos glicosados con las soluciones de **T0,25** y **T1**, los parámetros de agregación eritrocitaria tienden a los valores de los eritrocitos sin glicar (**GR**). Estos resultados sugieren que las soluciones de **trigonelina** de concentraciones 0,25 y 1 mg/mL revierten las alteraciones debidas a la glicación modificando la carga eléctrica de los eritrocitos y/o interactuando con las proteínas que conforman el glicocalix y la bicapa lipídica.

4.1.2 Sobre el fitoquímico quercetina

Los resultados demuestran que el protocolo para la incubación de tres horas es óptimo para realizar la incubación de GRg con soluciones de **quercetina**, debido a su naturaleza química, solubilidad y estabilidad.

En la Tabla 4.2 se presenta un resumen de los resultados más relevantes obtenidos para los **GR** y **GRg** tratados con las soluciones de **Q** a las concentraciones 10 y 100 μM .

Tabla 4.2: Síntesis de los resultados obtenidos para los **GR** y **GRg** tratados con las soluciones de **Q** en comparación con los eritrocitos lavados sin tratar (**GR**).

Muestra	Q μM	Viscoelasticidad eritrocitaria							Agregación eritrocitaria		
		ID	μ	η	$G'_{0,5}$	$G'_{1,5}$	$G''_{0,5}$	G''_1	CCA	IA	$t_{1/2}$
GR	10	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↓
	100	-	-	-	-	↑	-	-	↑	↑	↓
GRg0,4	0	-	↓	↓	-	↑	↓	-	↑	↑	↓
	10	--	↓-	-↑	--	--	↑↑	--	-↓	↑↓	↓-
	100	--	↓↓	-↑	↑↑	↑↑	↓↓	↑-	-↓	↑↓	-↑

↓ disminución significativa con respecto a GR
 ↓ disminución significativa con respecto a GRg
 ↑ aumento significativo con respecto a GR
 ↑ aumento significativo con respecto a GRg
 - sin diferencia significativa con GR
 - sin diferencia significativa con GRg

Al analizar los resultados de la Tabla 4.2 se observa que:

- los parámetros de viscoelasticidad eritrocitaria de los eritrocitos tratados con las soluciones **Q10** y **Q100** no presentan alteraciones significativas respecto a los **GR**, a excepción de un leve aumento significativo en el módulo de almacenamiento G' a la frecuencia de 1.5 Hz (situación similar a la que ocurre en pacientes con pulsación superior a la normal). Esto demostraría la hemocompatibilidad de la **quercetina** para las concentraciones de 10 y 100 μM .
- Respecto a las muestras **GRg** se observan cambios significativos en la viscosidad superficial de membrana, y que **Q10** y **Q100** revierten el valor de η modificado por

- la glicación. **Q100** aumenta el módulo de almacenamiento y disminuye la pérdida dinámica para las frecuencias 0,5 Hz y 1,5 Hz, sin evidencia de diferencias significativas a la frecuencia de 1 Hz (situación similar a la que ocurre en pacientes con pulsación normal) (resultados no presentados en la tabla).
- Al tratar los **GRg** con las soluciones de **Q10** y **Q100**, los parámetros de agregación eritrocitaria tienden a los valores de los eritrocitos sin glicar (**GR**). Estos resultados sugieren que las soluciones de **quercetina** de concentraciones 10 y 100 μM revierten las alteraciones debidas a la glicación al interactuar con las proteínas que conforman el glicocalix. Debido a la disminución de la cargas eléctrica negativa de los eritrocitos por efecto de la glicación, y teniendo en cuenta que la **quercetina** posee carga negativa a pH 7, ésta podría actuar ejerciendo un efecto pantalla sobre los eritrocitos, aumentando la repulsión electrostática y/o evitando el ingreso de la glucosa al interior celular a través de su transportador específico Glut 1.
 - Las diferencias observadas en los parámetros de viscoelasticidad y de agregación eritrocitaria sugieren la posible actividad antioxidante de **quercetina** reaccionando con la glucosa del medio y/o los componentes de la membrana eritrocitaria. La actividad antioxidante de **quercetina** ha sido demostrada, pudiendo inhibir la oxidación de la glucosa, al inhibir la enzima glucosa-oxidasa. También puede capturar radicales libres producidos durante la oxidación de la glucosa, reduciendo así la producción de especies reactivas de oxígeno (Pérez Trueba G, 2003; Ojito Ramos K et al., 2012). Además, el control del estrés oxidativo puede contribuir a la disminución de la inflamación crónica observada en pacientes diabéticos, que conlleva al deterioro de la función de tejidos y órganos (González Chávez A et al., 2011; Caparrós E, 2023).

4.1.3 Sobre el fitoquímico β -sitosterol:

El protocolo para la incubación de tres horas es óptimo para realizar la incubación de **GRg** con soluciones de **BS** con el disolvente ensayado, debido a la naturaleza química de este fitoquímico y la del disolvente utilizado. En la Tabla 4.3 se presenta un resumen de los resultados más relevantes obtenidos para los **GR** y **GRg** tratados con las soluciones de **BS** a la concentración 40 μM .

Tabla 4.3: Síntesis de los resultados obtenidos para los **GR** y **GRg** tratados con las soluciones de **BS** en comparación con los eritrocitos lavados sin tratar (**GR**).

Muestra	BS _d μM	Viscoelasticidad eritrocitaria			Agregación eritrocitaria			
		ID	μ	η	CA	C _{CA}	IA	t _{1/2}
GR	40	-	-	↑	↑	↓	↓	↑
GRg0,4	0	-	-	-	↓	↑	-	↓
	40	--	--	-↑	-↑	↓↓	-↓	-↓

↓ disminución significativa con respecto a GR
 ↓ disminución significativa con respecto a GRg
 ↑ aumento significativo con respecto a GR
 ↑ aumento significativo con respecto a GRg
 - sin diferencia significativa con GR

Al analizar los resultados de la Tabla 4.3 se puede observar que:

- No se observan alteraciones significativas de los parámetros viscoelásticos ID ni en μ en ninguna de las muestras tratadas con **BS_d**. Sin embargo, se observó un aumento significativo en η , tanto en las muestras **GR+BS_d** como en las muestras glicadas **GRg+BS_d**.
- En las muestras **GRg0,4** se observa que los parámetros de cinética de agregación eritrocitaria varían significativamente ($p < 0,05$), tendiendo a los valores del control **GR_d** sin glicar ($p > 0,05$).
- Los resultados sugieren una interacción del **BS_d** con el glicocalix, produciendo la disminución de la agregación eritrocitaria con la consecuente reversión del efecto de la glicación. El aumento de CA y la disminución en los valores de C_{CA} ($C_{CA} < 0$) demuestran la actividad antiagregante de **BS_d**, lo cual indicaría una posible interacción del **BS** con la glicocalix de la membrana eritrocitaria, tanto en los **GR** como en los **GRg**.

4.2 Conclusiones generales

Estos resultados muestran la actividad hemorreológica de los fitoquímicos ensayados, **trigonelina**, **quercetina** y **β -sitosterol**, con la posible alteración de las propiedades mecánicas y de agregación de la membrana eritrocitaria, logrando la reversión o la disminución de la agregación, que se encuentra acrecentada por la glicación, como se presenta en pacientes con diabetes.

Estos resultados serán de utilidad para futuros estudios sobre la acción de los tres fitoquímicos sobre las proteínas de membrana y la modificación de la carga superficial del glóbulo rojo y/o de las proteínas específicas. Por lo tanto, el estudio aporta a su uso como coadyuvante o antiagregante en el tratamiento de la Diabetes y otras patologías vasculares y/o desórdenes metabólicos. Además, los resultados obtenidos serán beneficiosos para el diseño de nuevos fármacos y distintas formas farmacéuticas de administración, como por ejemplo inyectables, que puedan utilizarse en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y de desórdenes metabólicos.

Las investigaciones sobre plantas medicinales en Argentina han avanzado en los últimos años, impulsadas por un creciente interés en la medicina tradicional y alternativa, así como en la biodiversidad única del país. Es de suma importancia identificar y validar los compuestos activos de las plantas medicinales estudiadas y comprender sus mecanismos de acción. Igualmente es necesario que tanto la comunidad científica como las autoridades sanitarias trabajen en la regulación y en la realización de una Farmacopea Nacional que incluya la elaboración de normativas para la producción y uso de estos productos, asegurando su calidad, seguridad y eficacia.

4.3 Perspectivas futuras

Actualmente los métodos de glicación *in vitro* se utilizan para investigar cómo la glicación afecta a las biomoléculas y para evaluar potenciales tratamientos de las patologías resultantes como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento. Avances recientes en este campo describen el uso de tecnologías avanzadas como la Espectrometría de Masas y las técnicas de imagen, como la fluorescencia y la microscopía confocal, aplicando modelos de glicación basados en células madre, uso de inhibidores de glicación y modificación de proteínas.

El empleo de los fitoquímicos estudiados como biomarcadores permitiría una identificación más precisa de los productos finales de glicación avanzada (AGEs), facilitando el análisis de las condiciones en que se ven afectadas proteínas específicas, pudiendo también ser utilizados para diagnosticar enfermedades o para evaluar la eficacia de tratamientos.

Además, los resultados obtenidos sobre las propiedades antiagregantes sugieren su posible uso como inhibidores de glicación, con el potencial de prevenir o reducir los efectos negativos de la glicación en las enfermedades asociadas, contribuyendo al diseño de nuevos fármacos. Futuras investigaciones *in vitro* permitirían evaluar la eficacia y la seguridad de estos inhibidores antes de su uso en ensayos clínicos y elucidar los mecanismos de acción a nivel molecular.

Por otra parte, el uso de modelos con células madre permitiría observar cómo ocurre la glicación y cómo sería afectado el eritrocito en condiciones cercanas a las del organismo vivo.

Apéndices

Apéndice A: Protocolos para la preparación de los medios de suspensión y de incubación

A-1 Solución PBS

Se preparó una solución salina de buffer fosfato de 300 mOsm/L y pH 7,4 (PBS), utilizando KH_2PO_4 1,4 mM + Na_2HPO_4 10 mM + NaCl 137 mM + KCl 2,7 mM.

Este PBS fue utilizado en las distintas etapas de la preparación de las muestras para el lavado de los GR y para la preparación de las soluciones de glucosa y la disolución de los fitoquímicos.

A-2 Solución PVP

Para las determinaciones con el Reómetro Eritrocitario se utilizó una solución isotónica de alta viscosidad de polivinilpirrolidona (PVP-360 marca Sigma Aldrich, Lote 96H0614) al 5 % en PBS (viscosidad de (20 ± 2) cp).

A-3 Soluciones de glucosa

1- Pesar en balanza analítica la cantidad de glucosa (dextrosa, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Laboratorio Biopack, Lote: 16882015) suficiente para preparar una solución madre al 1% P/V en PBS.

2- Realizar las diluciones a fin de obtener soluciones de concentraciones 0,2 g/dL, 0,4 g/dL, 0,6 g/dL, 0,8 g/dL y 1 g/dL. Homogeneizar suavemente manteniendo los tubos a temperatura ambiente.

Obtengo las muestras: **G0,2; G0,4; G0,6; G0,8 y G1.**

A-4 Soluciones de Trigonelina

1- Pesar en balanza analítica la cantidad de trigonelina (Lab. Sigma Aldrich Catálogo N° 000010 T5509) para preparar una solución de concentración final igual a 1 mg/mL a disolver en solución PBS.

2- Agitar hasta obtener una solución homogénea.

3- Filtrar

4- Diluir la solución hasta obtener la concentración de trigonelina 0,25 mg/mL. Se obtienen las muestras: **T1 y T0,25.**

- 5- Almacenar en frasco de vidrio color caramelo. Conservar en refrigerador por 24 horas.

A-5 Soluciones de Quercetina

- 1- Pesar en balanza analítica la cantidad de quercetina (Lab. Sigma Aldrich Catálogo N° 000070 Q4951) para preparar una solución de concentración final igual a 100 μM en PBS.
- 2- Agitar hasta obtener una solución homogénea.
- 3- Filtrar
- 4- Diluir la solución obtenida hasta obtener las concentraciones de quercetina a 10, 1 y 0,1 μM , obteniendo las muestras: **Q100; Q10; Q1 y Q0,1**.
- 5- Almacenar en frasco de vidrio color caramelo. Conservar en refrigerador por 24 horas.
- 6- Retirar del refrigerador unas horas antes de usar hasta tomar temperatura ambiente.

A-6 Solución de β -sitosterol

- 1- Pesar en balanza analítica la cantidad de β -Sitosterol (Lab. Sigma Aldrich, Catálogo N° 000040 85451, S1270, 95 % pureza) para preparar una solución de concentración final igual a 40 μM .
- 2- Primeramente disolver en alcohol bencílico/H₂O (71 mg/8 mL) agitando enérgicamente utilizando agitador de tubos (MS1 Minishaker marca Ika) y luego diluir 1/10 en PBS dos veces continuando la agitación, obteniendo la muestra **BS40d**.
- 3- Almacenar en frasco de vidrio color caramelo. Conservar en refrigerador por 24 horas.
- 4- Retirar del refrigerador unas horas antes de usar hasta tomar temperatura ambiente.

Apéndice B: Protocolo obtención de GR, lavado e incubaciones

B-1 Obtención de la muestra de sangre

Para la obtención de las muestras de sangre humana por punción venosa de donantes sanos extraídas por punción venosa en tubos estériles. (Guideline International Society of Clinical Hemorheology, International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods, 2009).

Las muestras fueron anticoaguladas con EDTA K₂ y se conservaron a 4°C hasta su utilización dentro de las 12 horas posteriores a su extracción.

B-2 Lavado de GR

1. Homogeneizar la sangre entera por inversión.
2. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 2000 rpm (Centrífuga Mini Spin Eppendorf AG 22331Hamburg).
3. Separar el plasma autólogo con pipeta Pasteur y guardarlo en un tubo para su uso posterior.
4. Eliminar la capa leucoplaquetaria (interface plasma/GR) con pipeta Pasteur.
5. Agregar 3 mL de PBS (pH=7,4 y 308 mOsm), homogeneizando lentamente por inversión.
6. Centrifugar durante 5 min a 2000 rpm a 25 °C y eliminar sobrenadante.
7. Registrar si se observa la presencia de hemólisis en cualquier etapa del procedimiento.

B-3 Determinación de la concentración de glucosa

La concentración de glucosa en el medio se midió con un dispositivo glucómetro del tipo Accu-Chek, laboratorio Roche (Figura B.1), sistema de detección enzima glucosa oxidasa. El medidor de glucemia Accu-Chek permite la determinación cuantitativa de la glucemia en sangre capilar fresca.



Figura B.1 Medidor de glucemia Accu-Chek Active y tiras reactivas para la medición.

El sistema de monitorización de glucemia, que se compone del medidor de glucemia y las tiras reactivas, es apto tanto para el autodiagnóstico como para el uso en el ámbito profesional. Las personas con diabetes pueden controlar su nivel de glucemia.

B-4 Glicación *in vitro* de GR

1. Preparar volúmenes iguales de GR lavados y solución de glucosa de las concentraciones a estudiar (0,2 g/dL, 0,4 g/dL, 1 g/dL y 2 g/dL).
2. Para el control (C0) se incuban volúmenes iguales de GR lavados con PBS.
3. Medir la glucosa a tiempo $t = 0$ en todos los tubos.
4. Incubar a 36,5°C durante 1 h con agitación suave controlada (agitador Boeco-Germany, Modelo Mini Rocker MR-1)
5. Retirar transcurridos 30 minutos de incubación y medir en todos los tubos la glucosa a $t = \frac{1}{2}$ h. Volver a incubar.
6. Repetir este procedimiento cada 30 minutos y medir la glucosa a $t = 1$ h; $t = 1$ y $\frac{1}{2}$ h y $t = 2$ h.
7. Transcurridas las 2 horas y realizadas las mediciones, lavar los GR tratados y el control con PBS como se indicó en los pasos 5 y 6 del Apéndice B2.
8. Registro de datos: Cada media hora transcurrida desde el $t=0$, realizar la medición de la concentración de glucosa en cada muestra mediante el método de hemoglucotest con dispositivo marca Accu-Chek. Este procedimiento se repite a las 2 y $\frac{1}{2}$, 3, 3 y $\frac{1}{2}$ y a las 4 horas con las muestras de GR lavados incubados con las distintas soluciones de Glucosa.

B-5 Incubación de GRg con soluciones de Trigonelina

1. Obtener los **GRg0,4** suspendiendo volúmenes iguales de coulot de GR lavados y solución de glucosa (0,4 g/dL) durante 2 hs a 37°C con agitación controlada. El control **GR** se obtiene suspendiendo iguales volúmenes de GR lavados y PBS.
2. Medir la concentración de glucosa a tiempo t0 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
3. Incubar durante 2 h a 37°C con agitación controlada todas las muestras y un tubo conteniendo solo sangre entera (**SE**).
4. Medir la concentración de glucosa a tiempo t1 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
5. Lavar una vez con PBS para eliminar restos de glucosa.
6. Suspender los **GRg0,4** y **GR** en partes iguales con las soluciones de **T0,25** y **1 mg/mL**) para obtener las muestras **GRg0,4+T0,25** y **GRg0,4+T1** y los controles **GR+T0,25** y **GR+T1**.
7. Incubar durante 1 h a 37°C con agitación controlada todas las muestras y el tubo conteniendo solo sangre entera (**SE**).
8. Medir la concentración de glucosa a tiempo t2 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
9. Lavar una vez con PBS para eliminar restos de trigonelina en todos los tubos excepto **SE** y **GR**.
10. Rotular las muestras **SE**, **GR**, **GR+T0,25**, **GR+T1**, **GRg04**, **GRg0,4+T0,25** y **GRg0,4+T1**.

B-6 Incubación de GRg con soluciones de Quercetina

1. Obtener los **GRg0,4** suspendiendo volúmenes iguales de coulot de GR lavados y solución de glucosa (0,4 g/dL) durante 2 hs a 37°C con agitación controlada. El Control **GR** se obtiene suspendiendo iguales volúmenes de GR lavados y PBS.
2. Medir la concentración de glucosa a tiempo t0 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
3. Incubar durante 2 h a 37°C con agitación controlada todas las muestras y un tubo conteniendo solo sangre entera (**SE**).
4. Medir la concentración de glucosa a tiempo t1 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.

5. Lavar una vez con PBS para eliminar restos de glucosa.
6. Suspender los **GRg0,4** y en partes iguales con las soluciones **Q10** y **Q100** para obtener las muestras **GRg0,4+Q10** y **GRg0,4+Q100** y los controles **GR+Q10** y **GR+Q100**.
7. Incubar durante 1 h a 37°C con agitación controlada todas las muestras y el tubo conteniendo solo sangre entera (**SE**).
8. Medir la concentración de glucosa a tiempo t2 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
9. Lavar una vez con PBS para eliminar restos de quercetina en todos los tubos excepto **SE** y **C0**.
10. Rotular las muestras: **SE**, **GR**, **GR+Q10**, **GR+Q100**, **GRg0,4**, **GRg0,4+Q10** y **GRg0,4+Q100**.

B-7 Incubación de GRg con soluciones de β -sitosterol

1. Obtener los **GRg0,4** suspendiendo volúmenes iguales de coulot de GR lavados y solución de glucosa (0,4 g/dL) durante 2 hs a 37°C con agitación controlada. El Control **GR** se obtiene suspendiendo iguales volúmenes de GR lavados y PBS. El Control de glóbulos rojos con el disolvente (**GRa**) se obtiene suspendiendo iguales volúmenes de GR lavados y solución diluyente.
2. Medir la concentración de glucosa a tiempo t0 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
3. Incubar durante 2 h a 37°C con agitación controlada todas las muestras y un tubo conteniendo solo sangre entera (**SE**).
4. Medir la concentración de glucosa a tiempo t1 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
5. Lavar una vez con PBS para eliminar restos de glucosa.
6. Suspender los **GRg0,4**, **GR** y en partes iguales con la solución **BS40a** para obtener las muestras **GRg0,4+BS40a** y los controles **GR+BS40a**, **GR** y **GRa**
7. Incubar durante 1 h a 37°C con agitación controlada todas las muestras y el tubo conteniendo solo sangre entera (**SE**).
8. Medir la concentración de glucosa a tiempo t2 en todos los tubos, mediante el uso de tiras reactivas Accu-Chek.
9. Lavar una vez con PBS para eliminar restos de β -sitosterol en todos los tubos excepto **SE** y **GR**.

10. Rotular las muestras: **SE, GR, GRd, GR+BS40d, GRg0,4, GRg0,4+BS40d.**

Apéndice C: Técnicas de análisis de la agregación y viscoelasticidad eritrocitaria

C-1 Adquisición de imágenes digitales microscópicas

1. Suspender los GR obtenidos a partir de las muestras tratadas en plasma autólogo al 0.3 % V/V.
1. Colocar una gota de una suspensión de GR en plasma autólogo en un portaobjeto sobre la platina del microscopio óptico invertido (apagar la luz del microscopio).
2. Dejar reposar 5 minutos. Encender la luz del microscopio y enfocar los GR.
3. Registrar 3 imágenes de cada muestra en distintos lugares del campo visual,
4. Una vez almacenadas todas las imágenes en una carpeta de la PC, subirlas a la nube y guardarlas en una memoria USB.

C-2 Determinación de los parámetros de viscoelasticidad eritrocitaria

Técnica: Difractometría laser con Reómetro Eritrocitario. Para ello,

1. Suspender cada muestra reconstituida en plasma autólogo al 40%, en solución PVP.
2. Medir cada muestra por quintuplicado
3. Obtenidas las gráficas, realizar los cálculos matemáticos con el software especialmente diseñado para obtener los parámetros de viscoelasticidad eritrocitaria

C-3 Obtención de los parámetros de cinética de agregación eritrocitaria

Técnica de transmisión laser con Agregómetro Eritrocitario de chip óptico. Para ello:

1. Preparar cada muestra al 40 % de hematocrito.
2. Colocar 15 μ L de cada muestra en el dispositivo o chip.
3. Realizar las mediciones por triplicado para cada muestra.
4. Producidas las gráficas analizarlas con el software especialmente diseñado para obtener los parámetros de agregación eritrocitaria.

Apéndice D: Modelo de consentimiento informado y dictamen.

HOJA DE INFORMACION

Lo invitamos a colaborar con el Proyecto de Tesis del Doctorado en Ciencias Biomédicas titulado: "Actividad hemorreológica de fitoquímicos comerciales presentes en plantas medicinales utilizadas popularmente en la Argentina para el tratamiento de la Diabetes", que se llevará a cabo por la doctorando Farm. Patricia Buszniez, dirigida por la Dra. Bibiana Riquelme y codirigida por la Dra. Mabel D'Arrigo.

El objetivo de esta investigación es estudiar las posibles alteraciones que pueden producir ciertos fitoquímicos comerciales sobre muestras de sangre. Estos compuestos químicos se encuentran en plantas medicinales utilizadas folclóricamente en la Argentina para el tratamiento de la Diabetes Mellitus que son utilizadas en forma de infusiones o cocimientos de sus partes vegetales. Este estudio permitirá obtener información sobre la acción de estos fitoquímicos sobre la sangre y su utilidad futura como antidiabéticos, particularmente en su presentación como forma farmacéutica inyectable.

La investigación tendrá una duración estimada de 4 (CUATRO) años y se llevará a cabo a través de la aplicación de distintas técnicas hemorreológicas, a partir de muestras sanguíneas obtenidas de donantes sanos, cuya extracción será realizada bajo la supervisión de la Dra. Mabel D'Arrigo y el criterio de selección de los donantes será supervisado por el Dr. Fernando Filippini (Facultad de Cs. Médicas). Previamente a la extracción de la muestra, la Dra. Mabel D'Arrigo presentará el Consentimiento Informado al paciente para firmarlo.

Los probables beneficios esperados como consecuencia de su participación en el proyecto son proveer una muestra de sangre para contribuir al estudio de los mecanismos por los cuales componentes de plantas medicinales puedan ser estudiados y utilizados de manera estandarizada para el tratamiento de la Diabetes.

Las posibles complicaciones que puedan producirse a partir de la extracción de sangre a la cual será sometido son: enrojecimiento en la zona afectada, leve mareo o descenso de la presión arterial. Si sufriese alguna de estas complicaciones, será atendido en forma totalmente gratuita por el equipo médico del proyecto.

El uso de dicha muestra no implica ningún riesgo ni efecto adverso para usted y que en caso de sobrar algo de la muestra de la sangre donada no se realizará ningún otro estudio que el que se ha informado y será descartada de acuerdo con las normas de Bioseguridad correspondientes.

CONSENTIMIENTO EXPLÍCITO

Yo, he leído y entendido la información de este estudio, he tenido tiempo suficiente para considerar mi participación en el mismo y soy consciente de que es completamente voluntaria. Entiendo y acepto que mis datos personales, así como la información privada que se me pida, serán usados únicamente por los investigadores que trabajan en este estudio y que mi nombre no será revelado en ningún caso y se mantendrá la confidencialidad de toda la información facilitada.

Dejo constancia de que he sido informado acerca de los objetivos de la investigación y de los procedimientos que se me realizarán y de que el investigador ha contestado todas mis preguntas. Doy mi consentimiento para que se me extraiga una muestra de mi sangre para ser utilizada en tal investigación. Por ello, tanto el investigador como yo firmamos dos copias de este formulario, siendo una de ellas para mí y la otra para el investigador.

Nombre del investigador.....
DNI.....

Firma del investigador..... Fecha.....

Nombre del paciente.....
DNI.....

Firma del paciente..... Fecha.....

Teléfonos útiles:

Farm. Patricia Buszniez: 0341-4938056

Directora de Tesis Doctoral Dra. Bibiana Riquelme: 0341-4804593 internos 282 y 294

Codirectora de Tesis Doctoral Dra. Mabel D'Arrigo: 0341-4804593 interno 214

Presidente Comité de Bioética Hospital Pcial. del Centenario Dra. Stella Pezzotto: 341 - 153669541


Dra. STELLA MARIS PEZZOTTO
PRESIDENTE
COMITÉ DE ETICA
HOSPITAL PROV. DEL CENTENARIO

A: Farm Esp Buszniez

Dictamen N° 551

Título del estudio: "Actividad hemorreológica de fotoquímicos comerciales presentes en plantas medicinales utilizadas popularmente en la Argentina para el tratamiento de la Diabetes."
Código de protocolo: ----
Patrocinante / Sponsor: ----
Nombre del PI: Farm Esp. Patricia Buszniez
Nombre de la institución: Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR

Rosario, 28 de diciembre de 2015

En el día de la fecha se reúne el Comité de Ética del Hospital Centenario y se aprueba:

- Proyecto de investigación y el formulario de Hoja de Información y Consentimiento explícito.

Se firman 3 ejemplares del mismo tenor y a un solo efecto.

Firma:



Fecha:

28/12/2015

Aclaración o sello:

Dra. STELLA MARIS PEZZOTTO
PRESIDENTE
COMITE DE ETICA
HOSPITAL PROV. DEL CENTENARIO

Bibliografía

- Abraham, M. H. & Acree Jr., W. E. (2014). On the solubility of quercetin. *Journal of molecular liquids*, 197, 157-159.
- Aktar, S., Ferdousi, F., Kondo, S. et al. (2023). La trigonelina se revela como posible herramienta para mejorar las funciones cognitivas. *Geroscience. Neurología. com*. doi: 10.10077/s11357-023-00919-x.
- Alet, A., Chiesa, M., Racca, L et al. (2001). Hemorreología comparativa. Estudios en diabéticos e hipertensos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 35(1), 63-68.
- Alet, A.; Alet, N.; Delannoy, M.; Fontana, A., & Riquelme, B. (2015). In *vitro* study of rheological effects of propofol on human erythrocyte. *Ser. Biom*, 39-44.
- Alet, A.; Basso, S., Castellini, H. et al. (2016). Hemorheological in vitro action of propofol on erythrocytes from healthy donors and diabetic patients. *Clinical Hemorheology Microcirculation*, 64, 157–165. doi:org/10.3233/CH-162054.
- Alet, A., Batista da Silva, M., Castellini, H. et al. (2021). In *vitro* alteration on erythrocytes mechanical properties by propofol, remifentanil and vecuronium. *Microvascular Research*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104132>.
- Alvin, C. P., Kevin, D. N. & Carmella E. M. (2016). Diabetes mellitus: diagnóstico, clasificación y fisiopatología. *Harrison, Principios de Medicina Interna*. 19º ed. McGraw-Hill Int. Ed. S. A., 417.
- American Diabetes association. Standards of Medical Care in Diabetes. (2019) Abridged for primary care providers. *Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association*, 37(1), 11.
- Andrade, S., Silva-Lucca, R., Santana, L. et al. (2011). Biochemical characterization of a cysteine proteinase from *Bauhinia forficata* leaves and its kininogenase activity. *Proc. Bioch.* pp. 572-578.
- Aristizabál, N. B. (2008). *Atlas de Hematología: Células Sanguíneas*. 2º Ed., Universidad Católica de Manizales.
- Arrieta, F., Iglesias, P., Botet, J. et al. (2016). Diabetes mellitus y riesgo cardiovascular: recomendaciones del Grupo de Trabajo Diabetes y Enfermedad Cardiovascularde la Sociedad Española de Diabetes, 48 (5).

- Asselta, R., Duga, S., & Tenchini, M. (2006). La base molecular de los trastornos cuantitativos del fibrinógeno. *Revista de Trombosis y Hemostasia*, 4^o Ed., 10, 2115–2129.
- Babu, N. & Singh, M. Analysis of aggregation parameters of erythrocyte in diabetes mellitus. (2005). *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 32, 269-277.
- Barreto Silva, F., Szpoganicz, B., Pizzolatti, A., Vieira Willrich, M. & Sousa, E. (2002). Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 83 (1-2), 33-37.
- Baskurt, O., Hardeman, M., Uykulu, M. et al. (2009). Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries. *Biorheology*, 46, 251-264. 10.3233/BIR-2009-0536.
- Baskurt, O., Haderman, M., & Rampling, M. (2007). *Handbook of Hermorheology and Hemodynamics*. Biomedical and Health Research, IOS Press, 455.
- Batista, M. S., Alet, A., Castellini, H. V., Riquelme, B. D. (2022). Methods: A new protocol for in vitro red blood cell glycation. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular and Integrative Physiology*, (264), 109-111. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111109>.
- Batista da Silva, M., Castellini, H., Alet, A., Riquelme, B. Alet, I. (2021). Estudio preliminar del efecto de agentes anestésicos en los parámetros reológicos de eritrocitos glicosados. *Anales AFA*, (31) 4, 117-120. <https://doi.org/10.31527/analesafa.2020.31.4.117>.
- Bessis, M., Mohandas, N. (1975). A diffractometric method for the measurements of cellular deformability. *Blood Cells*, (1), 307-315.
- Bouyahya, A., Balahbib, A., Khalid, A. et al. (2024). Artículo de revision: aplicaciones clínicas y conocimiento del mecanismo de acción de los flavonoides naturales contra la diabetes mellitus tipo 2, 10 (9).
- Brouillard, R. (1988). *The Flavonoids*. Ed., J. B. Harborne, New York, 525-538. doi.org/10.1007/978-1-4899-2913-6.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales*, 119. Ed. Acribia,
- Bucay, J. W. (2006). *Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria*. Instituto Politécnico Nacional. 1^o Ed.
- Burns, W., Twigg, S., Forbes, J. et al. (2006). Connective Tissue Growth Factor Plays an Important Role in Advanced Glycation End Product Induced Tubular Epithelial

- to Mesenchymal Transition: Implications for Diabetic Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2484- 2494.
- Buszniew, P. (2012) Trabajo Final Carrera de Especialización en Plantas medicinales. Biblioteca de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- Buszniew, P., Riquelme B. (2013). Estudio de la acción biorreológica de extractos de sarandí blanco en la adhesión eritrocitaria mediante el análisis digital de imágenes. *Publicaciones Reológicas* 1, 76-87. Editora UNR.
- Buszniew, P., Di Sapio, O. & Riquelme, B. (2014). Effects of *Phyllanthus sellowianus* Müll Arg. Extracts on the Rheological Properties of Human Erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 1407-1416.
- Buszniew, P., Lerda, N., Toderi, M. et al. (2017). Hemorheological action of trigonelline on in vitro glycated red blood. *Series on Biomechanics*, 30-35.
- Buszniew, P., Mascaro, G. H., Pusillico, R. et al. (2019). Relationship between glucose consumption and alteration in erythrocyte aggregation in a non-enzymatic glycosylation model in vitro. *Biocell*, 43,13. ISSN 1667-5746.
- Buszniew, P., Mascaro, H., Delannoy, M. et al. (2017). Caracterización fisicoquímica, óptica y reológica de soluciones extractivas de *Phyllanthus sellowianus* y *Bauhinia forficata*. *Anales AFA*, 28, 66-69.
- Brufau, G., Canela, M. & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28 (4), 217-225.
- Calixto, J. B., Santos, A. R., Cechinel, F. V. & Yunes, R. A. (1998). A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potency. *Medicinal Research Review*, 18 (4), 225-58.
- Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J. et al. (2000). Naturally occurring antinociceptive substances. *Phytoplant Research*, 401-418. doi.org/10.1590/S0100-879X2000000200004.
- Caparrós, E. (2023). Inflamación y microbiota: su influencia en la diabetes. *Revista Diabetes de la Sociedad Española de Diabetes*. doi: 10.2337/dc23-0083.
- Carrera, L., Etchepare, R., D'Arrigo, M. et al. (2008). Hemorheologic changes in type 2 diabetic patients with microangiopathic skin lesions A linear discriminant categorizing analysis. *Journal of Diabetes Complications*, 22 (2), 132-136.

- Chang C., Lin, Y., Bartolome, A. et al. (2013). Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 33.
- Chen, S., Gavish, B. & Yerdgar, S. (1996). Red blood cell aggregability *European Journal of Clinical Investigation*, 747-754.
- Cheng, Z., Bao, G., & Wang, N. (2000). Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion and molecular deformation. *Revista Biomédica*, 189-226. doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.189.
- Cieśla, M., Adamczyk, Z., Barbasz, J., & Wasilewska, M. (2013). Mecanismos de adsorción de fibrinógeno en sustratos sólidos a pH más bajo. *Langmuir*, 29 (23), 7005–7016.
- Ciunne, M., Toderi, M., Riquelme, B. (2017). Computational analysis of red blood cell aggregation kinetics to obtain representative parameters in healthy donors. *Series on Biomechanics*, 31 (3), 36-41.
- Cordell, G. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry Reviews*, 40, 1585-1612.
- Coskun, O., Mehmet, K, Korkmaz, A., Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidante, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacology Research*, 51 (2), 117-123.
- Cristiani, L. Q., & Amorin, J. L. (1972). Estudio preliminar del "sarandí Blanco", *Phyllanthus sellowianus* Müll Arg. (Euphorbiaceae). *Revista Farmacéutica*, 3-11.
- Cuevas A., Alonso R. (2016). Dislipidemia diabética. *Revista de Clínica Médica Las Condes*, 27 (2), 152-159.
- Curcio, S., Stefan, L., Randi, B., Días, M., da Silva, R., & Caldeira, E. (2012). Hypoglycemic effects of an aqueous extract of *Bauhinia forficata* on the salivary glands of diabetic mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 493-499.
- D'Arrigo, M., Valverde, J. & Rasia, R. (1999). Abnormal morphology of erythrocyte aggregates in diabetes by processing digitized microscopic images. *Biorheology* 36 (1), 185.
- D'Arrigo, M., Foresto, P., Rasia, R., & Valverde, J. (2002). Red blood cell adhesion. A method to be applied to the pathologies associated with protein carrying erythrocytic blood groups. *Acta bioquímica Clínica Latinoamericana*, 36(4) 593-598.

- Damasceno, D., Volpato, G., Calderon, I. M., Aguilar, R., & Rudge, M. (2004). Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Revista Phytton*, 196-201.
- Delannoy, M., Fontana, A., D'Arrigo, M. & Riquelme, B. (2014). Influence of hypertension and diabetes on erythrocyte aggregation using image digital analysis. *Series on Biomechanics*.
- Delannoy, M., Fontana, A., D'Arrigo, M., & Riquelme, B. (2015). Influence of hypertension and type 2 diabetes mellitus on erythrocyte aggregation using image digital analysis. *Series on Biomechanics*, 5-10.
- Di Paola, C. L. (2019). Propiedades medicinales del Sarandí Blanco. Remedios con Hierbas. Obtenido de <https://remediosconhierbas.com/sarandi-blanco>.
- Duarte-Almeida, J., Negri, G., & Salatino, A. (2004). Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 747-753.
- Dueñas Rivadeneiras, A. (2014). Identificación de especies vegetales utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, mecanismos de acción y modelos experimentales. *La Técnica*, 13, 64-73.
- EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF). (2019). Scientific opinion on the re-evaluation of benzyl alcohol as food additive. *EFSA Journal*, 17(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5876>.
- Elgsaeter, A., & Mikkelsen, A. (1991). Shapes and changes in vitro in normal red blood cells. *Acta Biochemical and Biophysics*, 273-290. DOI: 10.1016/0304-4157(91)90017-q.
- Equipo de Redacción de IQB Mediciclopedia. (2011). Toxinas [Monografía]. IQB. https://www.iqb.es/monografia/toxinas/a_bencilico.
- Eseberri, I., Miranda, J., Lasa, A. et al. (2019). Effects of quercetin metabolites on triglyceride metabolism of 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2).
- Eseberri, I., Laurens, C. Miranda, J. et al. (2021). Effects of physiological dosis of resveratrol and quercetin on glucosemetabolism in primary myotubes. *Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1-16.
- Farid, M. M., Yang, X., Kuboyama, T. y Tohda, C. (2020). Trigonelline recovers memory function in Alzheimer's disease model mice: evidence of brain penetration and target molecule. *Scientific reports*, 10 (1), 16424. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-7514-1>.

- Farnsworth, R. N. (1993). Ethnopharmacology and future drug development. J. Ethnopharmacology, 145-152. doi: 10.1016/0378-8741(93)90009-t.
- Feng, S., Gan, L., Yang, C. et al. (2018). Effects of stigmasterol and β -sitosterol on Nonalcoholic fatty liver disease in a mouse model: a lipidomic analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(13).
- Ferguson, J., & Kembrowski, Z. (1991). Applied Fluid Rheology. 1^o Ed., Elsevier Applied Science, 323.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Silva, S., Valentão, P., & Andrade, P. (2012). Bauhinia forficata Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. Food Chemistry, 134, 894-904.
- Filippini F. (2012). Determinantes hemorreológicos de la presión arterial. En: Publicaciones reológicas 1, 9-22. UNR Editora, Argentina.
- Fontana, A. B., Lerda, N., Delannoy, M. et al. (2012). Técnica de cuantificación de la agregación eritrocitaria por análisis digital de imágenes. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 46 (1), 47-52.
- Foresto, P., D'Arrigo, M., Carrera, L. et al. (2000). Evaluation of red blood cell aggregation in diabetes. Medicine, 60, 570- 572.
- Foresto, P., D'Arrigo, M., Carrera, L. et al. (2000) Evaluation of red blood cell aggregation in diabetes by computerized image analysis. Medicina 60, 570-572.
- Foresto P, D'Arrigo M, Gallo, Filippini F, Valverde JR, Rasia RJ. Comparative analysis of aggregate shapes by digitized microscopic images. Application to hypertension. Clinical Hemorheology and Microcirculation 26, 137-144, 2002.
- Fortunato, R. H. (1986). Revisión del género Bauhinia (Cercideae, Caesalpinoideae, Fabaceae) para la Argentina .Darwiniana, 527-557. <http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/bibliography/1824/1597>.
- Forzza, R. C., Leitman, P. M., Costa, A., Alves, A., & Carvalho, J. (2010). Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Ed., Jardim. Botánico, Rio de Janeiro, 1, 871.
- Fuentes. O., Arancibia Ávila, P. & Alarcón, J. (2004). Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. Fitoterapia, 75 (6), 527-532.
- Fuentes, O., Alarcón, J. (2006). *Bauhinia candicans* stimulation of glucose uptake in isolated gastric glands of normal and diabetic rabbits. Fitoterapia, 77(4), 271-275.
- García, M. E., & Reyes, N. J. (2011). Morfología polínica de dos especies de Bauhinia cultivadas en el Noroeste Argentino (Leguminosa Caesalpinoideae). Lilloa, 48 (1), 65-73.

- Garrote, S. H., Pacheco, M. G., Fagundo, J. C., Moran, P. V., & Antuna, M. G. (2012). Esferocitosis hereditaria: de la biogénesis a la patogénesis. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 28, 1-21. ISSN 0864-0289.
- Gary, A., Imran, S., Wang, S. et al. (2011). The hypoglycaemic effect of pumpkins as anti-diabetic and functional medicines. *Food Research International*, 44, 862–867.
- Gonçalves, V., Rodríguez-Rojo, S., De Paz, E. et al. (2015). Production of water soluble quercetin formulations by pressurized ethyl acetate-in-water emulsion technique using natural origin surfactants. *Food Hydrocolloids*, 51, 295-304. ISSN 0268-005X,
- González Chávez, A., Elizondo-Argueta, S., Gutiérrez-Reyes, G. & León-Pedroza, J. (2011). Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónica y el desarrollo de diabetes y obesidad. *Cirugía y cirujanos*, 79(2), 209-216.
- Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. (2012). Ed. 12°. Mc Graw Hill, México.
- Gutiérrez Hervás, M. (2019). Plantas medicinales empleadas como antidiabéticas en la medicina tradicional de áreas tropicales. Tesis de grado, 1-46.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Tratado de fisiología médica*. Ed.12°. Elsevier, Brasil.
- Haiyuan, Y., Shen, X., Liu, D. & Hong, M. (2019). The protective effects of β -sitosterol and vermicularin from *thamnia vermicularis* (Sw.) Ach. Against skin aging *in vitro*. *Biological Sciences. Anales Academia brasileira de ciencias*, 91(04).
- Halliwell, B. (2001). Free Radicals and other. *Encyclo. Life Science Nature*, 1-9.
- Hamburguer, M., & Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 3864-3874. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83425-K.
- Hieronymus, J. (1882). *Plantae Diaphoricae, Florae Argentinae*, Torno IV, G. Kraft (Ed.), 446.
- Hnatyszyn O, Ferraro G y Coussio J. (1996). Compuestos Fenólicos y Triterpénicos aislados de *Phyllanthus sellowianus*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 15(1), 21-28.
- Hnatyszyn, O., Miño, J., Gorzalczany, S. et al. (1997). Antidiabetic activity of *Phyllanthus sellowianus* in streptozotocin-induced diabetics rats. *Phytomedicine*, 4(3), 251-253.

- Hnatszyn, O., Mino, J., Gorzalczany, S, et al. (1998). Efecto antidiabético y toxicidad aguda del extracto acuoso del *Phyllanthus sellowianus* Müller Arg. Revista Dominguezia, 14(1), 13-18.
- Hnatyszyn, A. O., Broussalis, G., & Herrera. (1999). Argentine plant extracts active against polymerase and ribonuclease H activities of HIV-1 reverse transcriptase. Phytotherapy Research, 13(3), 206–209.
- Hnatyszyn, O., Ferraro, G. (1999). Sarandí Blanco. *Phyllanthus sellowianus* Müller Argentina. Fitociencia II, 2, 41-44,.
- Hnatyszyn, O., & Ferrano, G. (1985). Phyllanthol from *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae). Planta Medicinal, 51(5), 467.
- Hnatyszyn, O., Ferraro, G., & Coussio, J. D. (1993). Coumarins of *Phyllanthus sellowianus*. Fitoterapia, 64(6), 556.
- Hnatyszyn, O., Ferraro, G., & Coussio, J. D. (1995). Constituents of *Phyllanthus Sellowianus*. Fitoterapia, 66(6), 543.
- Horvat, S., & Jakas, A. (2004). Peptide and amino acid glycation: new insights into the: Maillard reaction. J. Pept. Sci, pp. 119-137.
- Huidobro, A. M., Torres, D. C., & Paredes, F. (2017). Diabetes Gestacional: asociación con grupo ABO. Revista Médica de Chile, 431-435.
- Hung, L., Falero Morejón A., Pérez Bolaños C. et al. (2005). Fitosteroles Parte 1. Tendencias actuales y aplicaciones biomédicas. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 36(1).
- Hussain, S. & Marouf, B. (2013). Flavonoids as alternatives in treatment of type 2 diabetes mellitus. Academia Journal of Medicinal Plants 1(2), 031-036.
- International Diabetes Federation. (2019). Atlas de la Diabetes de la FID. 9ª Ed. [Internet] International Diabetes Federation. 2019. Disponible en: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133352_2406-IDF-ATLAS-SPAN-BOOK.pdf .
- International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods. (2009). New guidelines for hemorheological laboratory techniques. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 42, 75–97.
- Iweala, E., Adurosain, O., Innocent, U. et al. (2024). Anti-Aging Potential of Bioactive Phytoconstituents found in edible medicinal plants: a Review. Sci, 6,36.
- Ji Young L., Hyun-Ju, D., Oh, Y. & Min, J. (2013). Efectos antiobesidad del extracto de cáscara de cebolla rico en quercetina sobre la diferenciación de preadipocitos

- 3T3-L1 y la adipogénesis en ratas alimentadas con alto contenido de grasa. *Toxicología alimentaria y química*, 58(22).
- Jorge, A., Horst, H., Souza, E., Pizzolatti, M., & Silva, F. (2004). Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interaction*, 149(3), 89-96. DOI: 10.1016/j.cbi.2004.07.001.
- Khalili, M., Alavi, M., Esmaeil-Jamaat, E. et al. (2018). Trigonelline mitigates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in the rat due to its anti-oxidative and anti-inflammatory effect. *International immunopharmacology*, 61, 355-362. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.019>
- Khodabandehlou, T., Le Dévéhat, C. & Razavian M. (1996). Impaired function of fibrinogen: consequences on red cell aggregation in diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 16, 303-312.
- Kiesewetter, H., Jung, F., Kotitschke, G, et al. (1988). Prevalence, risk factors and rheological profile of arterial vascular disease. First results of the Aachen study. *Folia Haematology*, 587-593.
- Koupý D, Kotolová H, Rudá-Kuäerová. (2015). Effectiveness of phytotherapy in supportive treatment of type 2 diabetes mellitus II. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) *Ceská a Slovenska Farmacie*, 64, 67–71.
- Kulkarni, M.; Puniyani, R. (1994). Study of hemorheological parameters in maturity onset diabetic cases. *Clinical Hemorheology*, 14(2), 271-278.
- Lapolla, A., Gerrardiger, C., Dal Fra, M. et al. (1991). Glycated erythrocyte membrane proteins and hemorheological parameters in insulin dependent diabetic subjects. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 11 (5), 405-415.
- Lebensohn, N., D'Arrigo, M., Carrera, L. et al. (2006). Estudio de la carga superficial eritrocitaria en pacientes Diabéticos. *Medicina*, 66(2), 26.
- Le Devehat, C., Vimeux, M. & Khodabandehlou, T. (2004). Blood rheology in patients with diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 30, 297-300.
- Lefer, D.J., Girod, S. J., Baines A. et al. (1999). Leukocyte–endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *American Journal of Physiology*, 1943–1950.
- Lemos, G., Márquez, B. L., Paraíso, L., & Penha-Silva, N. (2011). Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysica*, 531-537.

- Lerda, N., D'Arrigo, M. & Riquelme B. (2010). Alteraciones de carga superficial eritrocitaria por acción in vitro de la glucosa. *Medicina*, 70(2), 205.
- Lerda, N., Riquelme, B. & D'Arrigo, M. (2011). Alterations of the erythrocyte superficial charge by the in vitro effect of the glucose. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(1), 26.
- Lerda, N., Riquelme, B. & D'Arrigo, M. (2013). Alteraciones reológicas de la membrana eritrocitaria por acción in vitro de la glucosa. *Publicaciones Reológicas*, 1, 76-87. Editora UNR.
- Lerda, N. (2017). Estudio hemorreológico de los efectos de la glicación no enzimática en glóbulos rojos. Licenciatura en Biotecnología, Tesina de grado, facultad de ciencias bioquímicas y farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 1-73.
- Lévai, G., Martín, Á., De Paz, E., Rodríguez-Rojo, S., & Cocero, M. J. (2015). Production of stabilized quercetin aqueous suspensions by supercritical fluid extraction of emulsions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 100, 34-45.
- Linares, O. M., Rodríguez, A. P., & Sánchez, R. (2013). Morbilidad oculta de prediabetes y diabetes mellitus de tipo 2 en pacientes con sobre peso y obesos. *Medisan*, 17, 10-17.
- Ji Young L., Hyun-Ju, D., Oh, Y. & Min, J. (2013). Efectos antiobesidad del extracto de cáscara de cebolla rico en quercetina sobre la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 y la adipogénesis en ratas alimentadas con alto contenido de grasa. *Toxicología alimentaria y química*, 58(22).
- McMillan, D. E. (1990). The role of blood flow in diabetic vascular disease. In: *Diabetes Mellitus: Theory and Practice*. Elsevier, New York, 234-248.
- McMillan, D. E. (1993). Hemorheological studies in the diabetes control & complications trial. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 13(2), 147-154.
- Mao, X., Wu, L. F., Guo, H. L. et al. (2016). The Genus *Phyllanthus*: An Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Review. Hindustan Publishing Corporation, 1-36. doi.org/10.1155/2016/7584952.
- Marenzi, A. D., Rossignoli, J., & Bandoni, J. A. (1978). *Farmacopea Argentina*. Buenos Aires. Anmat, 1, 621.
- Marqués, G. S., Rolim, A. L., Alves, L. D., Silva, C. C., Soares, L. A., & Neto, R. J. (2013). Estado da arte de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) como alternativa

- terapêutica para o tratamento do Diabetes mellitus. *Revista Ciencias Farmacéuticas Aplicadas*, 34 (3), 313-320.
- Martínez Aguilar, Y., Martínez Yero, O., Córdova López, J. et al. (2011). Fitoesteroles y escualeno como hipocolesterolêmicos em cinco variedades de semillas de Cucurbita máxima y cucurbita moschata (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1). ISSN 1028-4796.
- Mascaro, H. G., Stella, M. B., & Riquelme, B. (2019). Evaluación Preliminar de la Actividad Hemoaglutinante e Extractos Acuosa de Bauhinia forficata y Phyllanthus sellowianus. *Sociedad de Biología de Rosario*, 115.
- Mascaro Grosso, H., Buszniez, P., Castellini, H & Riquelme, B. (2023) Efecto de extractos acuosa de Phyllanthus sellowianus sobre las propiedades viscoelásticas de glóbulos rojos humanos: actividad antidiabética. *Anales AFA* (ISSN: 1850-1168),. <https://anales.fisica.org.ar/index.php/analesafa/article/view/2385/2905>
- Mascaro Grosso, H., Buszniez, P. & Riquelme, B.D. (2023). Hemocompatibility and hemorheological activity of aqueous extracts from Phyllanthus Sellowianus. Effects on in Vitro Glycated Erythrocytes. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4645944> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4645944>
- Meiselman, H. (1999). Hemorheologic alterations in hypertension: chicken or eggs? *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 21, 195-200.
- Miyake, E. T., & Akisue, G. a. (1986). Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca *Bauhinia forficata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1, 58-68. doi.org/10.1590/S0102-695X1986000100007.
- Mohandas, N., & Evans, E. (1994). Mechanical properties of red cell membrane in relation to molecular structure a genetic defects. *Review Biophysic Biomolecular Structures*, 23, 787 - 818. doi.org/10.1146/annurev.bb.23.060194.004035.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112 (10), 48. [doi: 10.1182/sangre-2008-07-161166](https://doi.org/10.1182/sangre-2008-07-161166).
- Mucalo, I., Jovanovski, E., Vuksan, V. et al. (2014). American Ginseng Extract (*Panax quinquefolius* L.). Is safe in long-term use in Type 2 Diabetic Patients. *Evidence-based Complementary and alternative medicine*, (1), 969168.
- Murray, R. K., Bender, D. A., & Botham, K. M. (2010). Harper: Bioquímica ilustrada. México, McGraw-Hill, Ed. 28°, 687.

- Morales, S., Nícolo, A., Gay, Hernandez M. & Costa Castro E. (2013). Desarrollo de comprimidos de fitoesteroles de liberación convencional. Repositorio Académico de la Universidad de Chile.
- Nagai, R., Deemer, E., Brock, J., Thorpe, S., & Baynes, J. (2005). Effect of glucose concentration on formation of AGEs in erythrocytes in vitro. *Annals of New York Academy of Sciences*, (1043), 146-450. DOI: 10.1196/anales.1333.018.
- Natella, F., Nardini, M., Giannetti, et al. (2002) .Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 50, 6211-6216.
- Navarro, M., Coussio, J., Hnatyszyn, O., & Ferrano, G. (2004). Efecto Hipoglucemiante de Extracto Acuoso de *Phyllanthus sellowianus* (sarandí blanco) en Ratones C57BL/Ks. *Acta Farmacéutica Bonarense*, 23 (4), 520 - 523.
- Negri, G. (2005). Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas*, 41 (2), 121-142. doi.org/10.1590/S1516-93322005000200002.
- Ojito Ramos, K., Herrera Sánchez, Y., Vega Pérez, N. et al. (2012). Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. (Rutaceae).
- Oliveira, C., Maiorano, V., Marcussi, S., et al. (2005). Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 213-216.
- Ortiz, H., Sanchez, W., Mendez, J & Murillo, I. (2009). Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad. *Academia colombiana de ciencias*, 33 (127), 183-193.
- Paarvanova, B., Toleková, A., Ivanov, I. et al. (2013). Alteración estructural en la membrana de los eritrocitos de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. *Ciencias y Tecnología*, 3 (1), 153-157.
- Pepato, M., Baviera, A., Vendramini, R., & Brunetti, I. (2004). Evaluation of toxicity after one-month treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Medicina Complementaria Alternativa*, 1-7. doi: 10.1186/1472-6882-4-7.
- Perez Trueba, G. (2003). Flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista cubana de investigación biomedical*, 22 (1).

- Plá L., D'Arrigo M., Foresto P., Valverde J. y Rasia R. (1999). Effect of sialic acid digestion by trypsin on the morphology of erythrocyte aggregates. *Biorheology*, 36(1), 186.
- Poggi, M., Palareti, G., Biagi, R. et al. (1994). Prolonged very low calorie diet in highly obese subjects reduces plasma viscosity and red cell aggregation but not fibrinogen. *International Journal of Obesity*, 18, 490-496.
- Ponce de León, P., Toderi, M., Castellini, H. & Riquelme B. (2016). *In vitro* alterations of erythrocyte aggregation by action of *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*.
- Ponce De Leon, P., Bellini, M., Castellini, H. & Riquelme, B. (2020). Alterations of the erythrocyte membrane by *in vitro* action of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Journal of Helminthology*, 94, 1 - 5.
- Prochásková, D., Bousová, I. & Eilhelmová N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82 (4), 513-523.
- Properzi, G., Grassi, D., Casale R. et al. (2018). Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose- intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *Journal of Nutrition*, 138, 1671-1676.
- Qi LW, Liu EH, Chu C. et al. (2010). Anti-diabetic agents from natural products--an update from 2004 to 2009. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(4), 434-457.
- Raftos, J., Edgley, A., Bookchin, R. et al. (2001). Normal Ca²⁺ extrusion by the Ca²⁺ pump of intact red blood cells exposed to high glucose concentrations. *Journal Physics Cell*, 280 (6), 1449-1454. doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1449.
- Rasia, R. J., Porta, P. & García Rosasco, M. (1986). Shear deformation measurement of suspended particles. Applications to erythrocytes. *Instrumental Sciences*, 57, 33-35.
- Resmi, H., Akhunlar, H., Artmann, A. T., & Güner, G. (2005). *In vitro* effects of high glucose concentrations on membrane protein oxidation, G-actin and deformability of human erythrocytes. *Cell Biochemistry and Function*, 23(3), 163-168. doi: 10.1002/cbf.1129.
- Ríos, J., Francini, F. & Schinella, G. R. (2015). Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Medica*, 81(12/13), 945-974.
- Ríos, J., Francini, .F, Francini, F & Schinella, G. R. (2016). Productos naturales para el tratamiento de la diabetes: mecanismos de acción. *Fitoterapia*, 16, 17-31.

- Ríos, J., Francini, F., Schinella, G. R. & Francini, F. (2016). Productos naturales para el tratamiento de la diabetes 2: Ensayos clínicos. *Revista de Fitoterapia*, 16.
- Riquelme, B., D'Arrigo, M., Foresto, P. et al. (2003). Laser diffractometry technique for determination of stationary and dynamic viscoelastic parameters of erythrocyte in vascular pathologies. In: *Optical Coherence Tomography and Coherence Techniques*, Wolfgang Drexler, 229-237.
- Riquelme, B., Dumas, D., Fontana, A et al. (2011). Hemocompatibility and biofunctionality of two poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-co-poly(ethyleneglycol) copolymers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 99A(3), 445-454.
- Riquelme, B., Brenda, A., Marenzana, A. & Castellini, H. (2013). Reómetro Eritrocitario Invention Patent. AR 091467 B1. <https://lens.org/002-392-548-778-992>.
- Riquelme, B., Castellini, H., & Albea, B. (2018). Linear and Non-linear Viscoelasticity of Red Blood Cells using a New Optical Erythrocyte Rheometer. *Latin America Optics and Photonics Conference- OSA Technical Digest*. doi.org/10.1364/LAOP.2018.Th4A.41
- Riquelme, B. D., Foresto, P., D'Arrigo, M., Fillipini, F., & Valverde, J. R. (2006). Laser diffractometry technique: clinical applications to vascular pathologies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 35(1-2), 277 - 281.
- Riquelme, B., Foresto, P., D'Arrigo, M. et al. (2005). A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods*, 62, 131-41.
- Riquelme, B.; Toderi, M.; Batista, M. et al. (2022). New insights into the mechanics of erythrocytes: effects of radiation and several drugs of biomedical interest. *Series on Biomechanics.: Bulgarian Society of Biomechanics*, 36 (1) 61-69. DOI: 10.7546/SB.08.2022 http://jsb.imbm.bas.bg/page/en/details.php?article_id=546.
- Ross, M., & Pawlina, W. (2013). *Histología texto y atlas color con biología celular*. Ed. 6º, Panamericana, 13-16.
- Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J. & Cruz-Martins, N. et al. (2021). Phytosterols: From Preclinical Evidence to Potential Clinical Applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 599959.
- Sharma, P., Nanjajian, M., Kalra, S. & Chidambaram, K. (2019). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant potential of leaf and bark fractions of *Holoptelea*

- integrifolia (Roxb.) Planch. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 7(6), 421-432.
- Silva, P., Pinheiro, A., Rodríguez, L. et al. (2016). Fuentes naturales de fitosteroles y factores que lo modifican. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*, 66 (1). ISSN 0004-0622.
- Silva, K. L., Bivatti, M. W., Leite, S. N. et al. (2014). Phytochemical and Pharmacognostic Investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). *Journal Zeitschrift für Naturforschung C*, 478-480. doi.org/10.1515/znc-2000-5-627.
- Silvia, K., & Cechinel, V. (2002). Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, (25), 449- 454. doi.org/10.1590/S0100-40422002000300018.
- Simon, E, Razavian S, Le Veyec, J. et al. (1995). Influence of lipoprotein subfractions on dextran-anfibrinogen-induced erythrocyte aggregation *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 15, 667-676.
- Soleimanian, Y., Hossein Goli, S., Varshosaz, J. et al. (2020). β -Sitosterol Loaded Nanostructured Lipid Carrier: Physical and Oxidative Stability, In *Vitro* Simulated Digestion and Hypocholesterolemic Activity. *Pharmaceutics*, 12, 386.
- Sredevi Sangeeta, K., Umamajeswari, S., Uma Maheswara Reddy, C. & Narayana Kalkura, S.(2016). Flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents. *International journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7 (10), 3924-3930.
- Stoltz, J. F., Singh, M., & Rina, P. (1999). *Hemorheology in Practice*. Amsterdam, 128.
- Telen, M. I., & Lee, G. R. (1994). *Eritrocitos Maduros, hematología clínica de Wintrobe*. Ed. 9°. Interameric., México, 1, 80-109.
- Tempesta, M., Corley, D. G., Beutler, J. A. et al. (1988). Phyllanthinide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. *Journal of Natural Products*, 51 (3), 617-518.
- Thangasamy T.,Sittadjody S., Burd R. (2009). *Quercetin: A potential complementary and alternative Cancer Therapy*. Academic Press, 27, 563-84.
- Toderi, M., Castellini, H. V., & Riquelme, B. (2015). Simplified variant of an optical chip to evaluate aggregation of red blood cells. *SPIE BiOS*. 9531 (3), doi: 10.1117/12.2180907.
- Toderi, M., Castellini, H. & Riquelme B. (2017). Descriptive parameters of the erythrocyte aggregation phenomenon using a laser transmission optical chip. *Journal of Biomedical Optics*, 22 (1).

- Toderi, M., Galizzi, G., Riquelme, B., & Dumas, D. (2020). Study of the red blood cell aggregation by coherent anti-Stokes Raman. *SPIE BiOS*, 1-7. doi: 10.1117/12.2543073.
- Toderi, M., Riquelme, B. & Galizzi, G. (2022). Biospeckle laser as a tool to analyze erythrocyte aggregation. *Optical Engineering, SPIE*, 61(12), 1-5. <https://doi.org/10.1117/1.OE.61.12.124101>.
- Tolozza-Zambrano, P., Avello, M. & Fernández, P. (2015). Determinación de rutina y trigonelina en extractos de hojas de *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* y evaluación del efecto hipoglicemiante en humanos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14 (1), 21–32.
- Torregiani, F., Zeverin, U., Riquelme, B., & Rasia, R.J. (1995). Hemorheologic alteration In Diabetic patients. *Clinical Hemorheology*, 15, 687.
- Trojan, R., Alves, T., Soares, G., & Ritter, M. (2012). Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 155 - 163.
- Vallá, A., Martínez, M., Carmena, R. & Aznar, J. (1993). Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia. *Thrombosis Research*, 72, 119-126.
- Volpato, G., Damasceno, D, Rudge, M., Padovani, C., & Calderon, I. (2008). Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ethnopharmacology*, 116, 131-137.
- Weerawatanakorn, M., Kamchonemenukool, S., Koh, Y. & Pan, M. (2024). Exploring Phytochemical Mechanisms in the Prevention of Cholesterol Dysregulation: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72 (13).
- Zhou, J., Chan, L. y Zhou, S. (2012). Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Current medicinal chemistry*, 19(21), 3523-3531. <https://doi.org/10.2174/092986712801323171>.