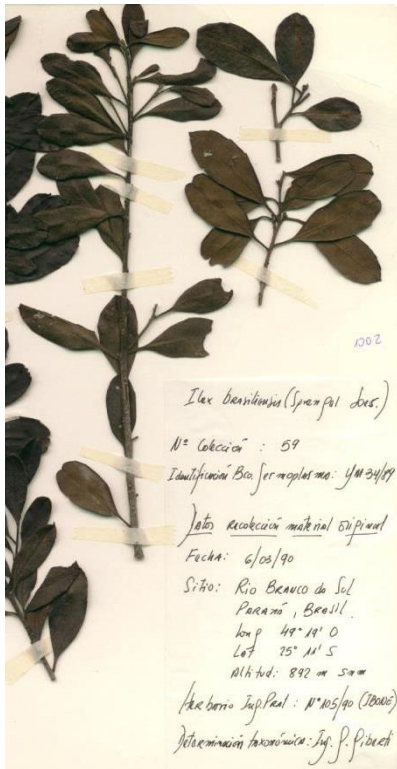




Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



Tesis de Magíster en Plantas Medicinales

“Actividad antioxidante y efecto cardioprotector de *Ilex brasiliensis*: un estudio comparativo con *Ilex paraguariensis* (yerba mate)”

Tesista: Guillermo Raúl Schinella
Directora: Dra. Silvia Laura Debenedetti
Codirectora: Dra. Etilé Dolores Spegazzini

2014

Dedicada:

A mis hijos

A la memoria de mi padre

A Horacio "tío" Tournier

*"La primera virtud del conocimiento es la capacidad de
enfrentarse a lo que no es evidente".*

Jacques Lacan (1901-1981)

Agradecimientos:

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Por lo que quiero hacer mi reconocimiento especial;

A Silvia Debenedetti, mi directora, por alentar y acompañar el cierre de una importante etapa de mi formación de posgrado, largamente postergada.

A Etile Spegazzini, mi codirectora, porque sin su apoyo y ayuda oportuna este trabajo no se podría haber realizado. También, destaco su permanente estímulo y confianza.

A Horacio Tournier, quien guió mis primeros pasos en la investigación científica, por los 30 años compartidos, porque crecí a su lado, porque aprendí de su tolerancia y especialmente porque se constituyó en mi modelo de *MAESTRO*.

A José María Prieto por las rutas transitadas, por las tertulias de arte, de ciencia, de mitos y de amores y desamores; por los afectos familiares compartidos y por mantener viva la capacidad de soñar. Me dio a conocer el término "toreo al alimón" y pudimos hacerlo realidad. Parfraseándole, "a quién, sino, podría llamar amigo". Ah!,... también por su colaboración con la determinación del análisis fitoquímico de los extractos con HPLC-UV.

A José Luís Ríos por sus 18 años de permanente apoyo académico que me permitió posicionarme y desarrollarme disfrutando de la farmacología de los productos naturales. En especial, por su extremada generosidad, su referencia de vida de cómo ser un *muy buen tipo*. Debo reconocer que es difícil igualarlo.

A Susana Mosca por ofrecer su laboratorio y sus conocimientos que me permitieron, durante los últimos 15 años, desarrollar proyectos de trabajo conjuntos referidos a la farmacología de los productos naturales en la fisiopatología del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión. Incluyo en este agradecimiento a Juliana Fantinelli por su colaboración asistiendo y asesorando los experimentos con órgano aislado, sin la cual todo hubiera resultado más difícil.

A Perla Mordujovich de Buschiazzo por abrirme un espacio en la Catedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP) para realizar mis tareas de investigación donde pude y puedo desarrollarlas con plena libertad bajo su dirección.

A Alicia Consolini, directora de la MPM, por su permanente aliento para que culmine este ciclo de formación de posgrado y desde su función de gestión, por su intervención oportuna para desempolvar y reactivar mi expediente.

A los docentes de la MPM que influyeron con sus lecciones y experiencias en mi formación; que hicieron su aporte en mi permanente búsqueda del "to be or not to be"

A Dave Watson por su desinteresada colaboración en la determinación de la flavonoides de los extractos estudiados mediante HPLC-MS.

A Sergio Prat Kricun por la desinteresada recolección y envío del material vegetal objeto del estudio.

A los compañeros Graciela Migliori, Gabriela Finarelli y Marcos Blanco que en diferentes momentos me acompañaron de un modo cordial durante el extenso recorrido que realicé para cursar la maestría.

A los amigos que alentaron a veces *imperativamente* y otras acompañándome con una *silenciosa resignación* mi formación de posgrado, me cabe reconocer los apoyos de Alejandra Tricerri, Benjamín Rojano, Silvia Aquila, Diego Cortes, Flavio Francini, Laura Bakás e Isabel Andújar.

A Analía, mi pareja, con quien *no me une el espanto sino el amor*, por su permanente aliento y apoyo en el diario vivir.

A todos ustedes, ¡mi mayor agradecimiento y gratitud!

“La creatividad requiere tener el valor de desprenderse de las certezas”

Erich Fromm (1900-1980)

Abreviaturas

$\lambda_{\text{máx}}$: longitud de onda máxima
 ABTS^{•+}: radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonato) de amonio
 Akt: proteín cinasa B
 AMPK: quinasa activada por AMP
 AMP: monofosfato de adenosina
 ATP: trifosfato de adenosina
 Bad: proteína pro-apoptótica
 BH4: tetrahidrobiopterina (también llamada sapropterina)
 BHT: butil hidroxitolueno
 CAT: catalasa
 CCF: cromatografía en capa fina
 Cf: concentración final
 COX: ciclooxigenasa
 CYP2E1: anilina hidroxilasa
 CYP450: citocromo P450
 DMSO: dimetil sulfóxido
 DNPH: 2,4-dinitrofenilhidracina
 DPPH[•]: radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo
 DTNB: Reactivo de Ellman, ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
 eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
 ERK1/2: cinasa regulada por señal extracelular
 ERN: especies reactivas de nitrógeno
 ERO: especies reactivas de oxígeno
 FRAP: "Ferric Reducing Ability of Plasma"
 GPCR: receptores acoplados a proteínas G
 GPX: glutatión peroxidasa
 GR: glutatión reductasa
 GSH: glutatión reducido
 GSK-3 β : glucógeno sintasa cinasa-3-beta
 HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
 IB: *Ilex brasiliensis*
 IP: *Ilex paraguariensis*
 LDL: lipoproteínas de baja densidad plasmáticas
 L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster
 LVDP: presión desarrollada en el ventrículo izquierdo
 MEB: microscopía electrónica de barrido
 MEK1/2: proteín cinasas activadas por mitógenos
 MO: microscopía óptica
 MPO: mieloperoxidasa
 NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
 NADPH-ox: NADPH oxidasa
 NBT: azul de nitrotetrazolio

NCX: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa B
NHE-1: intercambiador Na^+/H^+ isoforma 1
Nrf-2: factor nuclear eritroide 2
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
p70S6K: p70S6 cinasa (serina/treonina cinasa)
PBS: tampón fosfato salino
PCr: fosfocreatina
LVEDP: presión diastólica final en el ventrículo izquierdo
PI3K: fosfoinositol 3-cinasa
PP2A: proteína fosfatasa 2A
PPTM: poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria
PVI: presión del ventrículo izquierdo
Rf: Distancia de la sustancia desde el origen/Distancia del eluyente desde el origen
Rt: tiempo de retención
RISK: cinasas cardioprotectoras contra la injuria por reperfusión
RMN: resonancia magnética nuclear
SOD: superóxido dismutasa
SRTBA: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBA: ácido 2-tiobarbitúrico
TPTZ: 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
TR: tiorredoxina reductasa
TRX: tiorredoxinas
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
XOD: xantina oxidasa

Resumen

La relevancia de la investigación de *Ilex brasiliensis* (Spreng.) Loes. (Aquifoliaceae) se justifica en la proximidad filogenética y biogeográfica con *Ilex paraguariensis* (yerba mate), en su uso popular como sustituto o adulterante de la yerba mate y en la escasa información respecto a sus propiedades biológicas. Esta tesis estudia el órgano foliar que es la materia prima de uso popular para preparar las infusiones y se propone establecer características farmacognósticas, evaluar la actividad antioxidante y los efectos en la fisiopatología del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión.

En el análisis micrográfico se distinguen caracteres morfoanatómicos diferenciales con *I. paraguariensis*, en particular: los tipos de estomas, la estructura del haz vascular y la vaina de esclerénquima de la vena media foliar.

El estudio de *I. brasiliensis* utilizando HPLC-PDA-UV demuestra dos características fitoquímicas diferenciales respecto *I. paraguariensis*: la ausencia total de cafeína y la mayor riqueza en isoquercitrina. El análisis con HPLC-ESI-MS pone en evidencia que *I. brasiliensis* posee una mayor variedad de flavonoides derivados de quercetina y kaempferol. Los métodos colorimétricos determinan una mayor concentración de fenoles totales y ácido ascórbico.

I. brasiliensis posee una elevada actividad antioxidante *in vitro* como atrapador de radicales libres estables (DPPH y ABTS) y de especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno (superóxido y peroxinitrito). También, la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica enzimática y no enzimática de microsomas hepáticos de rata y proteger a las LDL de la peroxidación lipídica inducida por cobre. En comparación a *I. paraguariensis*, el extracto acuoso de *I. brasiliensis* tiene una mayor actividad antioxidante como atrapador de ABTS^{•+} y peroxinitrito y como reductor de Fe⁺³. Estos hallazgos se atribuyen a su mayor contenido de ácido ascórbico.

Los resultados alcanzados demuestran, por primera vez, que un extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* disminuye las alteraciones post-isquémicas de la función miocárdica y el daño oxidativo producidos como consecuencia del proceso de isquemia y reperfusión. Asimismo, que el mecanismo cardioprotector es dependiente de la NOS. Efectos similares se observan después del tratamiento con *I. paraguariensis*. Se postula que las acciones cardioprotectoras de *I. brasiliensis* no son simplemente debidas a sus propiedades redox; sino más bien, a la capacidad de algunos de sus constituyentes para unirse a proteínas dianas.

Índice

<i>Dedicatoria</i>	i
<i>Agradecimientos</i>	ii
<i>Abreviaturas</i>	iv
<i>Resumen</i>	vi
I. Introducción	1
II. Marco teórico	2
II.1. <i>Ilex brasiliensis</i> (Spreng.) Loes (Aquifoliaceae)	2
II.1.1. Situación taxonómica	2
II.1.2. Distribución y hábitat	3
II.1.3. Descripción botánica	3
II.1.4. Composición química	4
II.1.5. Farmacología	5
II.1.6. Uso popular	5
II.2. Metabolismo del oxígeno: Toxicidad del oxígeno	5
II.3. Antioxidantes naturales	7
II.4. Daño miocárdico por isquemia y reperfusión	10
III. Hipótesis	13
IV. Objetivos generales y particulares	14
V. Materiales y métodos	15
V.1. Material vegetal	15
V.2. Preparación del extracto	15
V.3. Estudios histológicos: Micrografía analítica	15
V.3.1. Microscopía óptica	16
V.3.2. Microscopía electrónica	16
V.3.3. Determinación de magnitudes proporcionales	17
V.4. Composición química	18
V.4.1. Determinación de fenoles totales: método de Folin – Ciocalteu .	18
V.4.2. Determinación de ácido ascórbico	18
V.4.3. Análisis con cromatografía en capa fina	19
V.4.4. Análisis con HPLC-PDA-UV	20
V.4.5. Análisis con HPLC-ESI-MS	20

V.5. Actividad antioxidante	21
V.5.1. Capacidad antioxidante total	21
V.5.2. Actividad atrapadora de ERO	24
V.5.3. Inhibición de la peroxidación lipídica	28
V.5.4. Actividad quelante	33
V.6. Fisiopatología del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión ..	34
V.6.1. Obtención del corazón aislado	34
V.6.2. Perfusión de corazones aislados de rata	35
V.6.3. Protocolo experimental	35
V.6.4. Evaluación de la función miocárdica	36
V.6.5. Evaluación del daño oxidativo miocárdico	36
V.7. Análisis estadístico	37
VI. Resultados	38
VI.1. Caracteres morfoanatómicos de las hojas de <i>I. brasiliensis</i>	38
VI.2. Composición química de un extracto acuoso de <i>I. brasiliensis</i>	40
VI.2.1. Determinación de fenoles totales y ácido ascórbico	40
VI.2.2. Análisis por cromatografía en capa fina: revelado con DPPH*	40
VI.2.3. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución.....	41
VI.3. Actividad antioxidante de <i>I. brasiliensis</i>	46
VI.3.1. Determinación de la actividad antioxidante total y atrapadora de ERO	47
VI.3.2. Inhibición de la peroxidación lipídica	49
VI.3.3. Actividad quelante	52
VI.4. Efectos de un extracto acuoso de <i>I. brasiliensis</i> en la fisiopatología del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión	52
VI.4.1. Función (sistólica y diastólica) miocárdica	52
VI.4.2. Daño oxidativo del tejido cardíaco	54
VII. Discusión	56
VII.1. Caracteres morfoanatómicos y fitoquímicos	56
VII.2. Actividad antioxidante y cardioprotectora	58
VIII. Conclusiones	64
IX. Bibliografía	65

I. Introducción

La importancia de los productos naturales para la medicina y la salud a lo largo de nuestra evolución ha sido enorme. Desde nuestros primeros ancestros que masticaban ciertas hierbas para aliviar el dolor o disponían ciertas hojas envueltas alrededor de las heridas para mejorar la curación, los productos naturales han sido, a menudo, el único medio para tratar enfermedades y lesiones. En las últimas décadas, los avances en la biología molecular y la química combinatoria posibilitaron el diseño racional de compuestos químicos específicos, por ende, los productos naturales adquirieron un papel secundario en el descubrimiento y desarrollo de fármacos.

Actualmente, las herramientas modernas de la química y la biología, en especial, las distintas tecnologías “-ómicas”, permiten a los científicos no sólo acceder con mayor detalle a la naturaleza de los efectos biológicos de los compuestos naturales sobre el cuerpo humano, sino también, descubrir posibles sinergias; por lo que su aplicación resulta de gran valor para el desarrollo de nuevas terapias contra diferentes enfermedades (Harvey, 2008; Ji *et al.*, 2009).

En los últimos 20 años, uno de los campos que despertó mayor interés en la investigación farmacognóstica está representado por el estudio de especies vegetales con propiedades antioxidantes, debido a su potencial aplicación en estados fisiopatológicos donde intervienen las especies reactivas derivadas del oxígeno (Halliwell, 1991).

Numerosos estudios dan cuenta de la variedad de propiedades biológicas de *Ilex paraguariensis* St. Hilarie (Aquifoliaceae) (Heck & de Mejia, 2007; Bracesco *et al.*, 2011; Andújar *et al.*, 2014). En particular, nuestro grupo de investigación demostró, entre otros aspectos, su actividad antioxidante utilizando diferentes modelos experimentales (Schinella *et al.*, 2000), su efecto cardioprotector en un modelo de isquemia y reperfusión en corazón aislado de rata (Schinella *et al.*, 2005) y recientemente, su actividad antiinflamatoria *in vivo* en modelos experimentales de inflamación aguda y crónica (Schinella *et al.*, 2014).

La elección de *Ilex brasiliensis* (Spreng.) Loes. (Aquifoliaceae) como objeto de estudio de esta tesis se fundamenta en las siguientes premisas: la proximidad filogenética y biogeográfica con *Ilex paraguariensis* (Cuénoud *et al.*, 2000; Goettlieb *et al.*, 2005), su uso popular como sustituto o adulterante de la yerba mate (Giberti, 1989) y la escasa información respecto de sus propiedades biológicas.

II. Marco teórico

II.1. *Ilex brasiliensis*

La familia Aquifoliaceae está organizada en cuatro grupos, cada uno de ellos con una peculiaridad geográfica y ecológica (Cuénoud *et al.*, 2000). Dentro de esta familia, el género *Ilex* L. constituye uno de los grupos que comprende más de 500 especies de árboles y arbustos dioicos distribuidos por las regiones templadas y tropicales del mundo (Galle, 1997). En Argentina, se han documentado la presencia de ocho especies (Instituto de Botánica Darwinion, 2014, Spegazzini *et al.*, 2002) (Tabla 1), entre las que se encuentra *I. brasiliensis* (Giberti, 1998), que es objeto de estudio de esta tesis; y también, *I. paraguariensis* que es la especie utilizada como referencia para su comparación.

Tabla 1. Ubicación en territorio argentino de las especies de *Ilex*

Especie	Distribución en Provincias
<i>Ilex affinis</i> Gardner	Misiones
<i>Ilex argentina</i> Lillo	Catamarca, Jujuy, Salta
<i>Ilex brasiliensis</i> (Spreng.) Loes.	Misiones
<i>Ilex brevicuspis</i> Reissek	Corrientes, Misiones
<i>Ilex dumosa</i> Reissek var. <i>guaranina</i> Loes.	Corrientes, Misiones
<i>Ilex dumosa</i> Reissek var. <i>dumosa</i> Reissek	Misiones
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. var. <i>paraguariensis</i> Loes.	Corrientes, Misiones
<i>Ilex theezans</i> Mart. ex Reissek	Misiones

II.1.1. Situación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Aquifoliales

Familia: Aquifoliaceae

Género: *Ilex*

Especie: *I. brasiliensis* (Spreng.) Loes. 1897

Sinonimia: *Rhamnus brasiliensis* Spreng., *Ilex brasiliensis* (Spreng.) Loes. f. *balansae*, *Ilex pubiflora* Reissek.

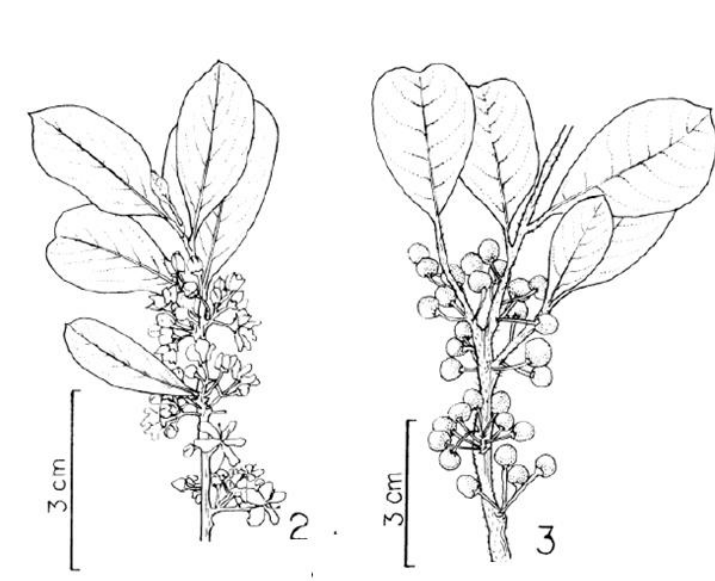
Nombres vulgares: "caá verá", "mate falso", "congonha", "kuatí nambí".

II.1.2. Distribución y hábitat

Ilex brasiliensis se distribuye en Argentina (Misiones), Brasil (Goiás, Minas Gerais, Paraná, São Paulo) y Paraguay (Alto Paraná, Amambay, Caaguazú, Caazapá, Canendiyú, San Pedro) (Giberti, 1998). Es una especie originaria del Cerrado brasileño y abunda en lugares bastante húmedos, tales como, bordes de arroyos, matorrales pantanosos y bañados (Gorne Viani & Santos Vieira, 2007).

II.1.3. Descripción botánica

Ilex brasiliensis es un árbol o arbusto de 2 a 6 m de altura. Ramitas jóvenes siempre pubescentes, corteza de color castaño oscuro o castaño grisáceo, yemas en general pubescentes; entrenudos de 2 a 30 mm. Hojas con pecíolos casi siempre pubescentes, limbo coriáceo, elíptico, obovado, oblongo; casi siempre muy pubescente en la cara abaxial pero no en la adaxial, ésta con pubescencia únicamente sobre el nervio medio o el margen; margen entero, revoluto; base aguda u obtusa, a veces decurrente con el pecíolo; ápice emarginado-mucronulado, obtuso, raro agudo o acuminado; estípulas glabras o pubescentes. Inflorescencias, flores dioicas, sobre ramas de la última brotación o sobre las brotaciones anteriores; las masculinas y femeninas en general se presentan en fascículos corimboides o dicasios, rara vez flores solitarias. Flores (5-6) meras, cáliz con sépalos en general pubescente y borde irregular. Corola con prefloración imbricada o carinal, y pétalos obovados u ovados. El fruto es globoso o elipsoide, color púrpura oscuro o marrón rojizo con dorso y cara ventral lisas (Giberti, 1998; Gorne Viani & Santos Vieira, 2007).

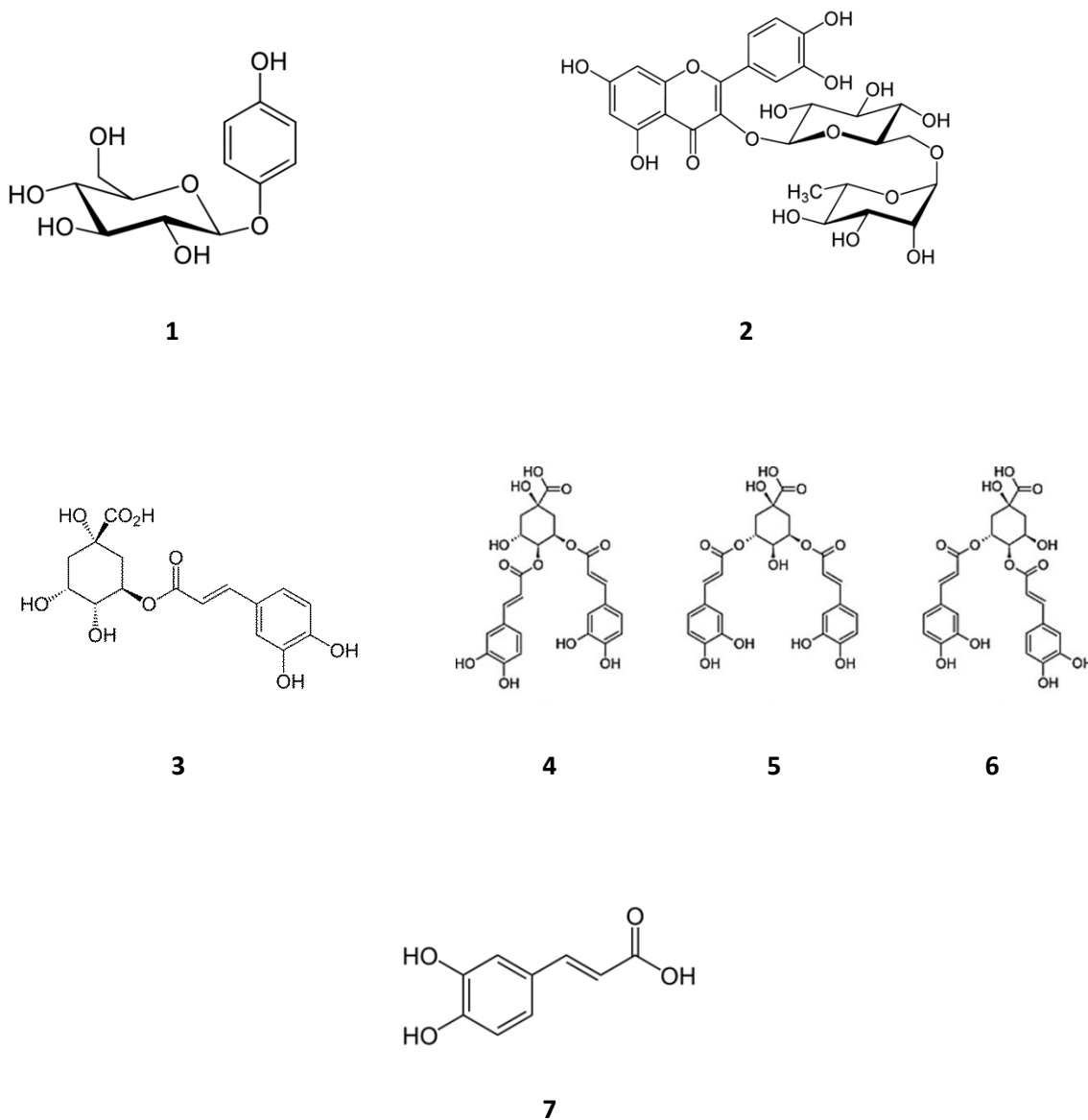


Ilex brasiliensis: 2. Ramo con flores, 3. Ramo con frutos
Obtenido de Gorne Viani & Santos Vieira (2007)

II.1.4. Composición química

En la última década, estudios metabolómicos realizados con espectroscopia de RMN, en varias especies de *Ilex* que crecen en Sudamérica concluyeron que *I. brasiliensis* se caracteriza por una cantidad mayor de arbutina (**1**) y ácidos dicafeoilquínicos; hasta entonces (**1**) no se había descrito como un constituyente de estas especies (Choi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010).

Filip *et al.* (2008) realizaron un estudio fitoquímico de un extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* mediante HPLC-UV donde identificaron y cuantificaron los compuestos mayoritarios: rutina (**2**), ácido clorogénico (**3**), ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (**4**), ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (**5**), ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico (**6**) y ácido cafeico (**7**).



II.1.5. Actividades biológicas / farmacológicas

La revisión bibliográfica sobre actividades biológicas con *I. brasiliensis* se realizó utilizando las bases de datos de Pubmed y Scopus. El criterio de búsqueda en estas bases fue: [TITLE-ABS-KEY (ilex brasiliensis OR rhamnus brasiliensis OR ilex pubiflora)]. El resultado de la búsqueda arrojó 20 publicaciones (16 de abril de 2014; 11:44 AM) de las cuales sólo dos trabajos se corresponden con estudios de actividad biológica/farmacológica. Uno de ellos describe la actividad antiproliferativa de un extracto acuoso de *I. brasiliensis* en una línea celular de linfoma (Filip *et al.*, 2008) y en el otro se presentan resultados parciales sobre la actividad antioxidante y cardioprotectora, que forman parte de la presente tesis (Schinella *et al.*, 2009).

II.1.6. Uso popular

El principal empleo de *I. brasiliensis* es como sustituto o adulterante de la yerba mate (Graham, 1984; Giberti, 1989).

II.2. Metabolismo del oxígeno. Toxicidad del oxígeno

La oxidación de diferentes compuestos es un proceso esencial de los organismos aeróbicos desde que el oxígeno se constituyó en el último receptor de electrones en el sistema que produce energía en forma de ATP.

Todas las células aeróbicas son capaces de sintetizar especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO); aproximadamente un 2% del O_2 utilizado por las mitocondrias resulta en la formación de estas especies (Figura 1). Las ERO se caracterizan por una alta reactividad química, tienen una vida media muy corta y son capaces de producir efectos deletéreos en el organismo.

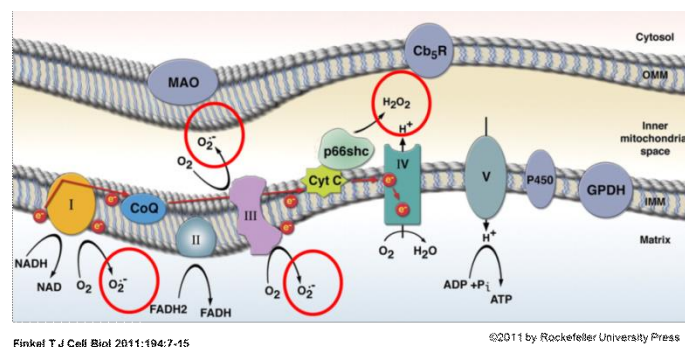


Figura 1. Generación de ERO ($O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2) en la mitocondria

En un estado fisiológico normal, la principal fuente de producción de las ERO es la cadena respiratoria mitocondrial. Las ERO también se generan en el retículo endoplásmico (ej.: citocromo P450), membrana celular (ej.: NADPH oxidasa), peroxisoma (ej.: acil-CoA oxidasa) y citosol (ej.: xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa inducible), dependiendo del tipo celular y tejido. También, éstas pueden generarse durante la metabolización de xenobióticos, exposición a radiaciones ionizantes y en diferentes situaciones fisiopatológicas (Finkel & Holbrook, 2000).

Las ERO incluyen compuestos que son radicales libres y no radicales (Tabla 2). Cuando el nitrógeno participa en la formación de especies químicas oxidantes estas especies pueden denominarse “especies reactivas derivadas del nitrógeno” (ERN).

Tabla 2. Principales especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)

Radicales libres		Especies no radicales	
ERO			
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	HO^{\bullet}	Hidroperóxidos	ROOH
Alcoxi	RO^{\bullet}	Hipoclorito	ClO^-
Peroxi	ROO^{\bullet}	Oxígeno singlete	1O_2
Lípido radical	R^{\bullet}	Ozono	O_3
Radical carbonato	$CO_3^{\bullet -}$		
ERN			
Óxido nítrico	NO^{\bullet}	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}	Aducto peroxinitrito/ CO_2	$ONOOCO_2^-$

Es importante destacar que existen numerosos trabajos científicos que describen a las ERO/ERN interviniendo en la regulación de una variedad de procesos celulares, tales como, la proliferación, metabolismo, diferenciación y supervivencia (Finkel & Holbrook, 2000; Valko *et al.*, 2007; Finkel, 2011; Ray *et al.*, 2012).

En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la generación y la eliminación de ERO/ERN es necesario para mantener la función adecuada de las proteínas involucradas en la señalización sensible a procesos redox. Normalmente, la homeostasis redox asegura que las células respondan adecuadamente a estímulos endógenos y exógenos (Trachootham *et al.*, 2008). Bajo tales condiciones, las células poseen un sistema de defensa antioxidante para eliminar las ERO/ERN y mantener la homeostasis redox. Este sistema incluye componentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros componentes se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 ; el cual es reducido a H_2O por la catalasa o descompuesto por peroxidasas dependientes del glutatión. En el segundo grupo de

componentes se incluyen la vitamina E, carotenos, ácido ascórbico, glutatión, peptidos-histidina, transferrina, ferritina, uratos y tioles de proteínas plasmáticas. Estos dos últimos revisten mayor importancia por su capacidad captadora de radicales libres en el plasma sanguíneo (Valko *et al.*, 2007).

El aumento significativo de ERO/ERN producido por desequilibrios entre sus procesos de formación y el sistema de defensa antioxidante genera *estrés oxidativo*; lo que produce la pérdida de la integridad celular, la función enzimática y la estabilidad genómica. Este daño oxidativo parecería estar involucrado en el envejecimiento y en varias enfermedades degenerativas relacionadas con él, como las enfermedades cardiovasculares, cataratas, disfunciones cognitivas y cáncer (Valko *et al.*, 2007).

En atención a que la eficiencia de nuestro sistema de defensa antioxidante puede no ser satisfactoria y, también, a que en algunas situaciones fisiopatológicas las ERO/ERN son producidas en exceso, se propone la suplementación de la dieta con compuestos antioxidantes para disminuir la acumulación de efectos oxidativos bajo dichas condiciones (Aruoma, 1994).

II.3. Antioxidantes naturales

Dos especialistas notables en el tema que nos ocupa son Halliwell y Gutteridge, quienes en principio definieron que un antioxidante es "cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato" (Halliwell & Gutteridge, 1995). Recientemente y con un enfoque más farmacológico, estos autores propusieron como definición de antioxidante "cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo en una molécula diana" (Gutteridge & Halliwell, 2010). Entre sus propiedades destacan la capacidad de formar un nuevo radical que sea estable posterior a su oxidación, después de atrapar el radical libre (Halliwell, 1990).

Lo postulado por Khlebnikov *et al.* (2007) se focaliza más en los mecanismos que operan en este tipo de compuestos. Así, los antioxidantes pueden ser comprendidos como "cualquier sustancia que neutraliza directamente o indirectamente las ERO, aumentando la actividad de las defensas antioxidantes o inhibiendo la producción de ERO".

Por lo expuesto, se deriva que la actividad antioxidante puede ser eficaz a través de diversos mecanismos (Figura 2):

- 1) suprimiendo la formación de ERO/ERN por inhibición de los sistemas enzimáticos que las generan o quelando los elementos metálicos que producen radicales libres.
- 2) atrapando las ERO/ERN.
- 3) aumentando o protegiendo el sistema de defensa antioxidante.

En las últimas décadas se acumularon muchas evidencias respecto a los beneficios del consumo de frutas y vegetales sobre la salud humana. Se demostró que ese tipo de alimentación provee un grupo de compuestos denominados “polifenoles” que podrían cumplir un rol importante en la defensa antioxidante. Estos compuestos se encuentran en las plantas en cantidades variables, en general, en altas concentraciones e incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos, entre otros (Quideau *et al.*, 2011) (Figura 3).

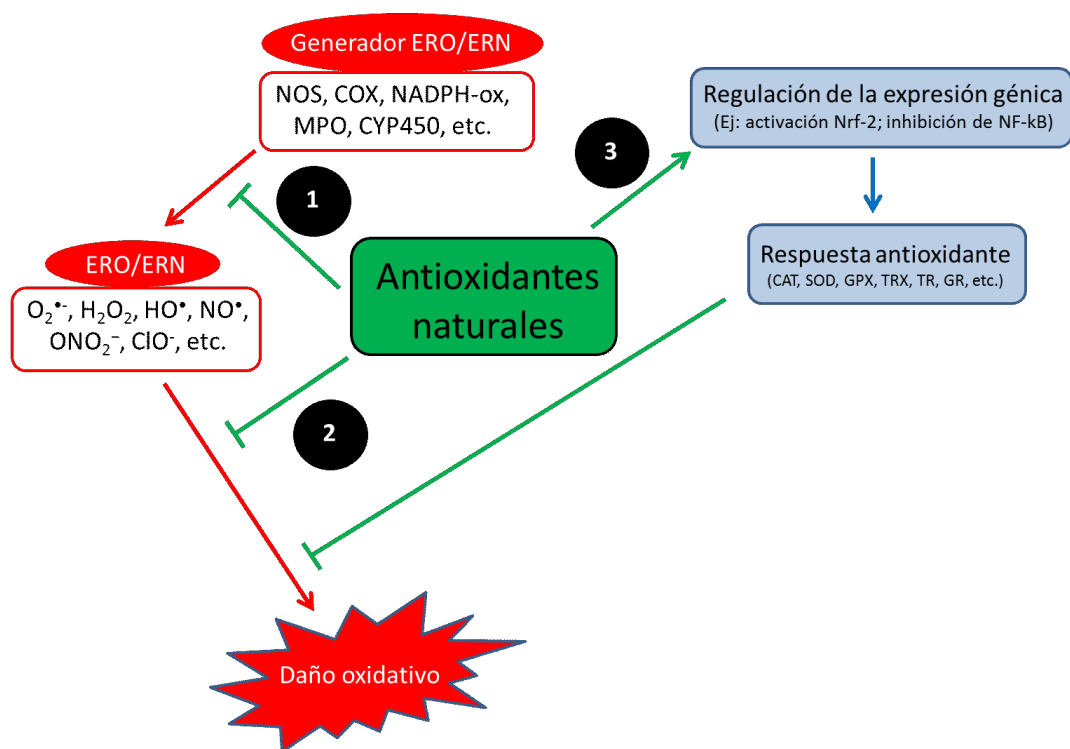


Figura 2. Diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes
(Adaptado de López-Alarcón & Denicola, 2013)

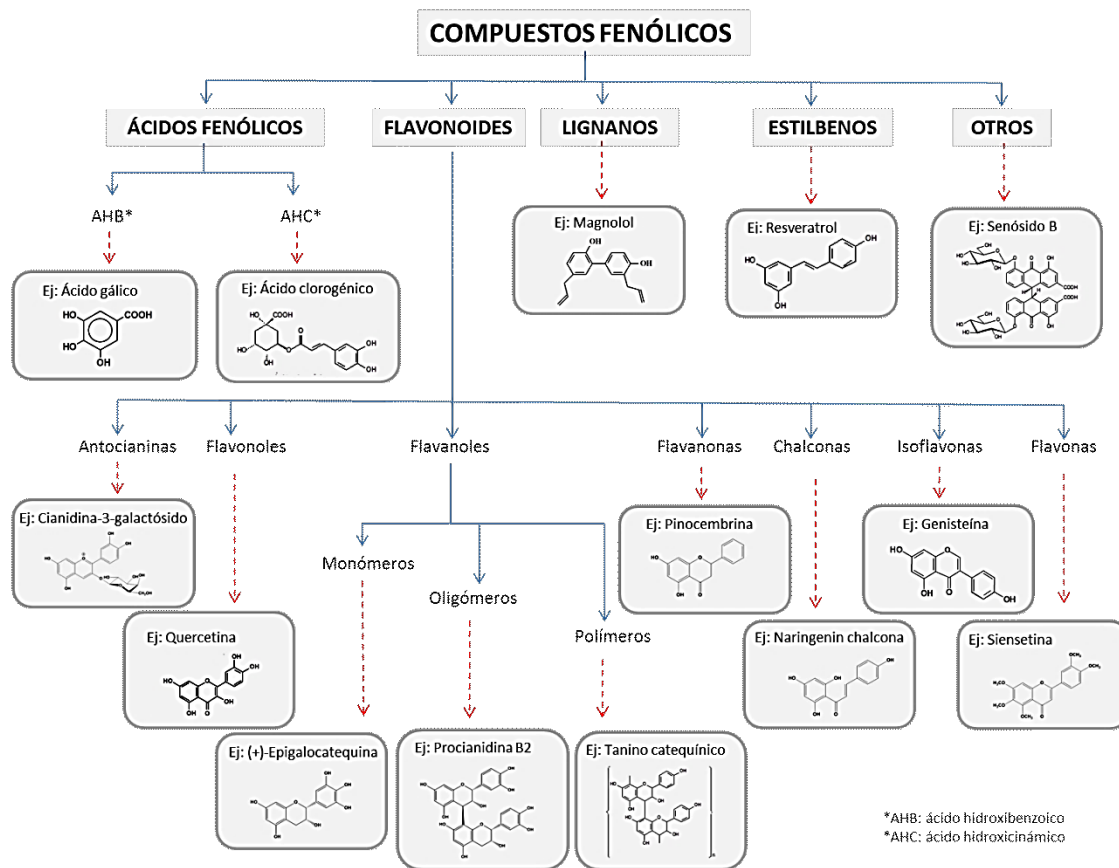


Figura 3. Principales tipos de compuestos fenólicos de origen vegetal

Un gran número de publicaciones científicas demuestran la actividad antioxidante *in vitro* de una variedad de productos naturales usando diferentes modelos experimentales. Algunos compuestos fenólicos son potentes antioxidantes *in vitro*, más potentes que los carotenoides o las vitaminas C y E (Rice-Evans *et al*, 1997; Pietta, 2000, Cos *et al*, 2001; Pannala *et al.*, 2001, Brewer, 2011).

En la actualidad, existe evidencia convincente de que los mecanismos por los que los polifenoles vegetales ejercen sus acciones de protección contra las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, así como en el cáncer y la diabetes, no se deben simplemente a sus propiedades redox; sino más bien, a su capacidad para unirse directamente a las proteínas (o péptidos) dianas. Tal modo de acción podría producir la inhibición de enzimas, la modulación de los receptores o factores de transcripción que pueden regular las funciones celulares, afectando las vías de transducción de señales (Zhang *et al.*, 2010, Quideau *et al.*, 2011).

El estudio de las propiedades farmacológicas de productos vegetales con una importante composición en compuestos fenólicos constituye un importante punto de partida

para aislar e identificar las sustancias, estudiar los mecanismos de su acción y evaluar su actividad en el tratamiento de diferentes patologías asociadas a la generación de ERO.

II.4. Daño miocárdico por isquemia y reperfusión

La célula miocárdica, como todas las células del organismo, consume O_2 y elimina CO_2 y H_2O como resultado de su metabolismo aeróbico. Esta tarea conduce a la formación, sobre todo a partir de ácidos grasos y carbohidratos, de fosfatos de alta energía (ATP y PCr), que la célula utiliza para el mantenimiento de la asimetría iónica de transmembrana y la actividad mecánica.

En condiciones normales, el ATP y la PCr son producidos por el metabolismo aeróbico a través de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria. Cuando el flujo coronario se reduce (*isquemia*), el O_2 aportado es inadecuado para soportar la fosforilación oxidativa y el ATP sólo es proporcionado por el metabolismo anaeróbico. Durante la isquemia se generan protones (H^+) y lactato que llevan a la acidosis intracelular, la que activa mecanismos alcalinizantes. De estos mecanismos, el más importante es la activación del intercambiador Na^+/H^+ , siendo la isoforma 1 (NHE-1) de mayor atención, por ser la que predomina en el músculo cardíaco.

El NHE-1 mueve H^+ hacia el espacio extracelular e ingresa Na^+ al interior de la célula promoviendo el aumento de la concentración intracelular de dicho ion ($[Na^+]_i$) y contribuyendo al efecto producido por la disminución de la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, por la falta de ATP. El aumento de la $[Na^+]_i$ conduce a la sobrecarga de Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), operando de forma inversa. De esta manera, en la isquemia se genera un aumento de los niveles citosólicos de Na^+ y de Ca^{2+} (Murphy & Steenbergen, 2008) (Figura 4).

Durante la isquemia el pH intra y extracelular son ácidos. Sin embargo, durante la reperfusión el pH extracelular vuelve rápidamente a la normalidad. El mantenimiento de la acidosis intracelular refuerza la activación del NHE-1 y, secundariamente, la activación del NCX, llevando a la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico que conduce a un aumento de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial.

La reintroducción de oxígeno (*reperfusión*) permite la generación de ATP, pero el daño producido en la cadena de transporte de electrones durante la isquemia resulta en un aumento de la generación mitocondrial de las ERO (Murphy & Steenbergen, 2008) (Figura 5).

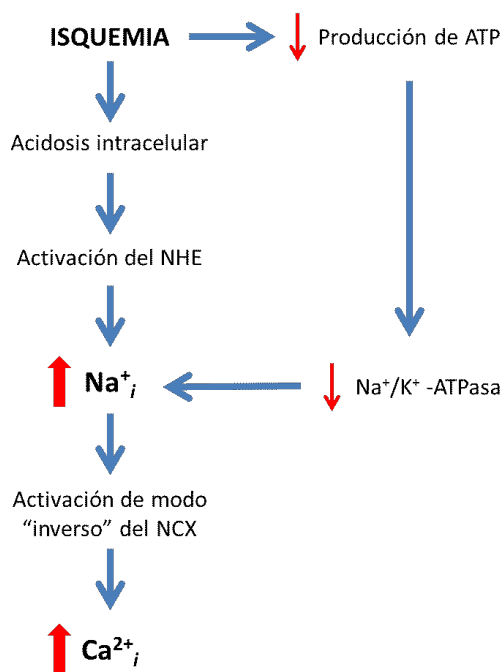


Figura 4. Cascada de eventos que ocurren durante la isquemia.

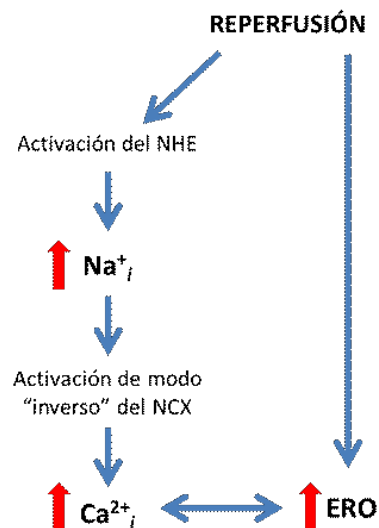


Figura 5. Acontecimientos que tienen lugar durante la reperfusión.

La sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y el aumento de las ERO puede dar lugar a la apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM), lo que compromete aún más la funcionalidad del cardiomiocito (Perricone & Vander Heide, 2014).

El óxido nítrico (NO) que se forma a partir de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) juega un rol importante en las alteraciones cardiovasculares que siguen al proceso de isquemia y reperfusión. Normalmente, pequeñas cantidades de NO, generado por la NOS endotelial (eNOS), regulan el tono vascular. La isquemia y reperfusión provoca la activación e inducción de diferentes isoformas de NOS y, como consecuencia, se genera un aumento de NO, el que desencadena, a nivel de la función miocárdica efectos contradictorios.

Diversos trabajos muestran que durante la isquemia y reperfusión el NO producido por la activación de la eNOS, a través de vías que involucran cinasas cardioprotectoras (RISK), modula la función celular mediante la activación de la guanilato ciclasa y atenúa la apertura del PPTM (Hausenloy & Yellon, 2007; Heusch *et al.*, 2008; Schumacker, 2013) (Figura 6). Otros trabajos, también indican que el NO interviene a través de la S-nitrosilación de proteínas, desempeñando un papel importante en la cardioprotección (Sun & Murphy, 2010, Schumacker, 2013). Sin embargo, existe información acerca del aumento del daño miocárdico por el NO, atribuido a la formación de peroxinitrito (Valko *et al.*, 2007). Este anión, resultado

de la reacción entre el NO y el $O_2^{\cdot-}$, provoca nitración de residuos de tirosina y peroxidación lipídica, que son procesos implicados en la génesis de la injuria miocárdica. Los resultados de estudios recientes demuestran que el balance entre NO y las ERO desempeña un papel crucial en la modulación de las alteraciones subsiguientes al insulto isquémico (Heusch, 2008; Perricone & Vander Heide, 2014).

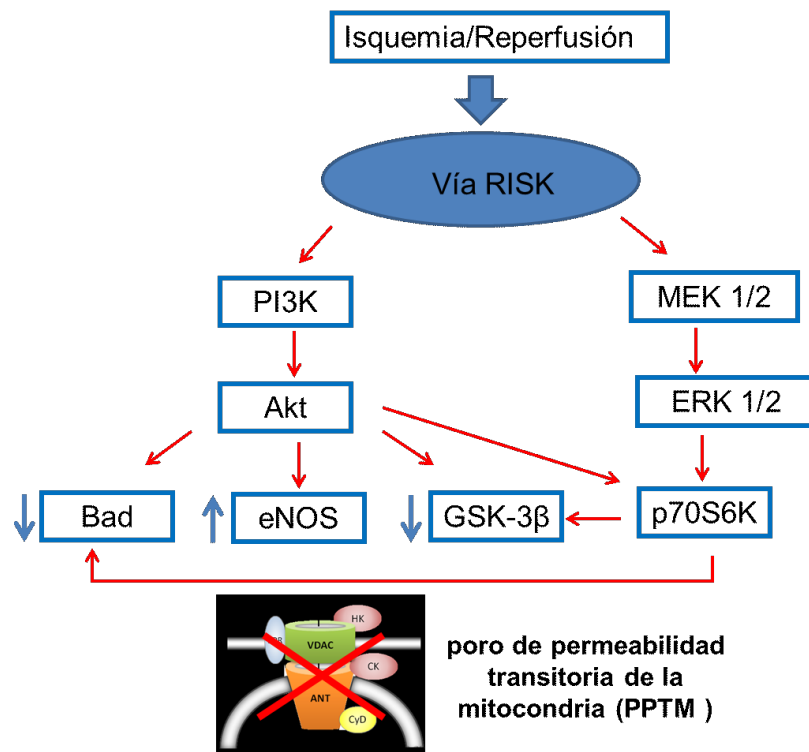


Figura 6. Cinasas cardioprotectoras contra la injuria por reperfusión (RISK)

Si bien, la restauración del flujo sanguíneo es un prerrequisito para salvar a la célula miocárdica, ésta puede también aumentar el daño ya generado por la isquemia, lo que se conoce como “daño por reperfusión”. Cuando la isquemia es corta, el daño por reperfusión se traduce en una disminución transitoria de la contractilidad, llamada *atontamiento miocárdico*; mientras que, cuando la isquemia es prolongada, ocurre la muerte celular responsable del *infarto de miocardio*.

En síntesis, tanto el *atontamiento* como el *infarto* se deben a la interacción entre dos hechos que ocurren durante la isquemia y reperfusión, por una parte, la acumulación de Ca^{2+} y, por otra, la producción de las ERO. Así, el uso de antioxidantes resultaría beneficioso para disminuir el daño funcional y oxidativo que ocurre durante este proceso.

III. Hipótesis

Ilex brasiliensis es una fuente de antioxidantes y previene y/o protege el daño oxidativo en un modelo de isquemia y reperfusión miocárdica, de manera comparable a *Ilex paraguariensis*.

IV. Objetivos generales y específicos

Generales

- 1) Determinar características farmacognósticas de *Ilex brasiliensis*.
- 2) Evaluar el efecto de un extracto acuoso de *Ilex brasiliensis* en la fisiopatología del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión.

Específicos (en hojas de *I. brasiliensis*)

- ✓ Establecer los caracteres histológicos de diagnóstico.
- ✓ Examinar la composición polifenólica de un extracto acuoso.
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de un extracto acuoso.
- ✓ Examinar el efecto de un extracto acuoso sobre la función miocárdica y el daño oxidativo en el proceso de isquemia y reperfusión.
- ✓ Estudiar los mecanismos de la acción cardioprotectora del extracto acuoso, evaluando principalmente la participación de las especies reactivas derivadas del nitrógeno.

En este estudio se utilizó *Ilex paraguariensis* (yerba mate) como especie de referencia comparativa.

V. Materiales y métodos

V.1. Material vegetal

Las partes aéreas de *Ilex brasiliensis* (Spreng.) Loes. e *Ilex paraguariensis* St. Hilarié fueron colectadas en la Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Misiones, Argentina) por el Ing. Agr. Sergio Prat Kricun, durante el mes de marzo de 2002.

El material vegetal colectado fue identificado por la Dra. Etilé Spegazzini (Prof. Asociado de Farmacobotánica, Universidad de Belgrano, Argentina). Muestras de *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis* fueron depositadas en el Herbario del Museo de Botánica y Farmacognosia “Carlos Spegazzini” de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina) con los números LPE 1005 y 938, respectivamente.

El material vegetal fue secado *in situ* con corriente de aire caliente en condiciones suaves para impedir la descomposición y/o hidrólisis de los compuestos químicos presentes. Las hojas secas fueron molidas finamente para facilitar su extracción.

V.2. Preparación del extracto

Las hojas secas y pulverizadas de ambas especies de *Ilex* se extrajeron con agua destilada caliente (90 °C) en una relación 10 %P/V; se enfrió a temperatura ambiente con agitación esporádica hasta que el extracto alcanzó los 40-45 °C. Luego, el extracto se filtró y liofilizó. El material seco se conservó en desecador a -20 °C hasta su uso. Los rendimientos de la extracción de *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis* fueron de 8,9 % P/P y 9,5 % P/P respectivamente. Los extractos se disolvieron en agua bidestilada inmediatamente antes de cada ensayo.

V.3. Estudios histológicos. Micrografía analítica

Durante las últimas décadas se desarrollaron diversos métodos analíticos para la identificación o aseveración de genuinidad de las especies vegetales; con el fin de garantizar la calidad del material estudiado. Uno de estos métodos es la *micrografía analítica* que se asume por su utilidad y confiabilidad. Al respecto, se destaca que la Organización Mundial de la Salud, en sus Monografías sobre Plantas Medicinales, incluye a la microscopia como un método válido para la caracterización botánica de la droga vegetal (WHO, 1999).

El análisis micrográfico aplicado a las drogas vegetales se basa en el reconocimiento y la valoración cualitativa y cuantitativa de caracteres diagnósticos, mediante el estudio de los tejidos, en ocasiones, complementado con reacciones histoquímicas (Gatusso, 2013). En la mayoría de los casos el simple análisis cualitativo del material en observación resulta suficiente como para emitir juicios valederos en cuanto a su origen. En caso de no resultar suficiente este análisis se recurre a los métodos cuantitativos que consisten fundamentalmente en la determinación de uno o más elementos histológicos por unidad de superficie, peso, etcétera, de manera de obtener valores característicos para el vegetal en cuestión.

En esta investigación se aplican dos métodos cuantitativos de uso más frecuente en la micrografía para el control de vegetales: el Índice de Estomas y el Índice o Proporción de Empalizada específicos para hojas. Ambos métodos permiten establecer el *status taxonómico* para la diferenciación de especies de un mismo género.

V.3.1. Microscopía óptica

En las observaciones de la epidermis foliar con microscopio óptico se empleó material seco y se procedió a su diafanización y eliminación de cutícula (Carpano *et al.*, 1994) para la visualización de las células epidérmicas, estomas, hidátodos y células en empalizada.

Los cortes transversos de hojas se practicaron con un micrótopo de Ranvier, a partir de material seco, hidratado en caliente y fijado en alcohol absoluto: ácido acético glacial (3:1). Una parte del mismo se diafanizó con NaOH al 10%P/V y se coloreó con Safranina-Fast Green (D'Ambroggio de Argueso, 1986; Strittmatter, 1979).

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Olympus CH equipado con tubo de dibujo. La simbología utilizada es la propuesta por Metcalfe & Chalk (1979).

V.3.2. Microscopía electrónica

Se empleó microscopía electrónica de barrido (EMB) para la observación de la epidermis foliar. Las hojas se hidrataron a temperatura ambiente durante 60 h, se lavaron con agua destilada clorada y se fijaron en disolución FAA (alcohol etílico 50%: formaldehído 40%: ácido acético glacial; 90:5:5) durante 48 h. Luego, con ayuda del microscopio estereoscópico se seccionó una pequeña pieza de material, se lo secó en papel de filtro y montó sobre una platina de aluminio cubierta de cinta adhesiva, terminando el secado con una luz puntiforme. Las observaciones y fotomicrografías se efectuaron con un Jeol JSM-T100 del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo de Ciencias Naturales de La Plata (UNLP). La

terminología utilizada para describir la ornamentación de la cutícula con MEB es la brindada por Wilkinson (1979).

V.3.3. Determinación de magnitudes proporcionales

Índice de estomas: Se trabajó con 25 muestras de hojas diafanizadas y se realizó el conteo en 10 campos microscópicos distintos y seleccionados, dibujándose las observaciones por medio del tubo de dibujo en unidades de superficie representadas en cuadrados de 10 cm de lado.

El cálculo del índice de estoma se realizó a través de la ecuación sugerida por Salisbury (1927):

$\text{Índice de estoma} = \frac{S}{S + E} \cdot 100$	<p><i>S</i>: número de estomas por unidad de área. <i>E</i>: número de células epidérmicas en la misma área.</p>
---	---

Índice de empalizada: Se emplearon hojas diafanizadas las que fueron examinadas en visión frontal o adaxial. Las células en empalizada aparecen con el aspecto de pequeños círculos perceptibles por debajo de las células epidérmicas (Zornig & Weiss, 1925).

Este índice representa la cifra media de células de este tipo que aparecen debajo de una célula epidérmica. El mismo se obtiene contando el número de células en empalizada que se encuentran debajo de cuatro células epidérmicas y dividiendo por cuatro.

El cálculo del índice de empalizada se realizó a través de la ecuación:

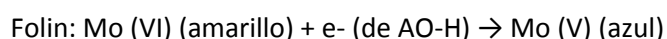
$\text{Índice de empalizada} = \frac{E}{4 Ep} \cdot 100$	<p><i>E</i>: número de células en empalizada <i>Ep</i>: número de células epidérmicas</p>
--	--

El índice de empalizada se obtuvo procesando 25 muestras de hojas diafanizadas tomando fragmentos de 5 mm de lado. Se efectuaron observaciones microscópicas dibujándose las observaciones por medio del tubo de dibujo en unidades de superficie representadas en cuadrados de 10 cm de lado.

V.4. Composición química

V.4.1. Determinación de fenoles totales. Método de Folin – Ciocalteu

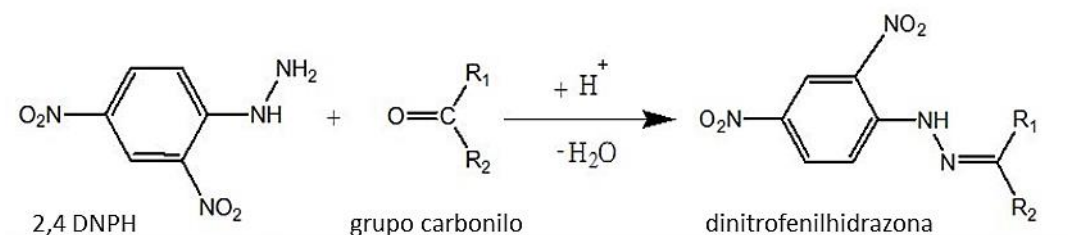
El reactivo de Folin es un heteropolianión molibdofosfowolfrámico en el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un electrón donado por un antioxidante. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidarse los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm (Singleton & Rossi, 1965).



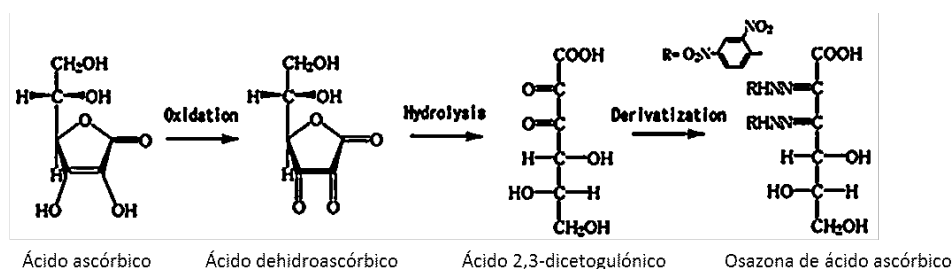
La mezcla de reacción consistió en adicionar por cada 50 μL de una dilución apropiada de los extractos, 800 μL de agua destilada, 100 μL de una disolución de carbonato de sodio al 20 %P/V y 50 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta disolución se dejó reposar por 1 hora y, luego, se leyó la absorbancia a 765 nm. Se construyó una curva de calibración con ácido gálico (Sigma-Aldrich, USA) como referencia. El contenido total de fenoles se expresó como equivalentes (EQ) mg de ácido gálico/g de extracto seco.

V.4.2. Determinación de ácido ascórbico

La 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) puede usarse para detectar cualitativamente los grupos carbonilo de cetonas y aldehídos. El resultado es positivo cuando hay un precipitado rojo o amarillo (dinitrofenilhidrazona).



El contenido total de vitamina C se determinó colorimétricamente por reacción de 2,3-dicetogulónico con DNPH; después de añadir sulfúrico, la osazona de ácido ascórbico formada se midió por su absorción a 520 nm (Roe & Kuether, 1943).



Brevemente, un volumen de una dilución apropiada de los extractos se mezcló con un volumen de ácido tricloroacético (10 %P/V), los tubos se mantuvieron en baño de agua/hielo durante 10 min y a continuación se centrifugaron 3000 x *g*, durante 10 min a 4 °C.

El sobrenadante libre de proteínas (500 µL) se mezcló con 100 µL de una disolución DNPH (Cf= 30 mg/mL), tiourea (Cf= 4 mg/mL) y SO₄Cu (Cf= 0,5 mg/mL) disueltos en ácido sulfúrico 9 N; la mezcla de reacción fue incubada a 37 °C durante 3 h. A continuación se agregaron 750 µL ácido sulfúrico (65 %v/v) y se midió la absorbancia a 520 nm. Se empleó ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA) como referencia con el cual se construyó una curva de calibración y los resultados fueron expresados como mg de ácido ascórbico/mg de extracto.

V.4.3. Análisis por cromatografía en capa fina (Fantinelli et al., 2005).

Los extractos liofilizados de *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis* se disolvieron (10 mg/mL) en agua bidestilada y se extrajeron 3 veces con igual volumen de acetato de etilo. La fracción orgánica se recolectó y se llevó a sequedad a presión reducida en un rotavapor. El rendimiento de la extracción fue de 10 %P/P para ambos extractos.

El análisis de la fracción de acetato de etilo se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) sobre Silica gel 60 F254 (Merck, Germany) usando una fase móvil constituida por acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial : agua (100:11:11:26).

Se utilizaron como compuestos de referencia quercetina (Extrasynthese, France), kaempferol (Extrasynthese, France), rutina (Extrasynthese, France), isoquercitrina (Extrasynthese, France), ácido cafeico (Sigma-Aldrich, USA), ácido clorogénico (Sigma-Aldrich, USA) y ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (obtenido como se describe en Góngora *et al.*, 2002).

Tras el desarrollo cromatográfico, las placas de CCF fueron rociadas con una disolución metanólica de DPPH[•] (0,2 %P/V) y pasados 30 min se procedió a captar una imagen digital. Los compuestos antioxidantes, con capacidad atrapadora de DPPH[•] aparecieron como una mancha amarilla sobre un fondo violáceo.

V.4.4. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución con detección por arreglo de diodos (HPLC-PDA-UV).

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-PDA-UV) se realizaron en un cromatógrafo líquido de alta presión (Merck-Hitachi) equipado con una bomba L-6200 y un detector de arreglo de fotodiodos L-7455 y válvula de inyección con capacidad de 100 μ L (Reodyne).

La separación se realizó utilizando una precolumna (4 x 4 mm, 5 μ m, Merck) y columna (250 x 4,6 mm de fase reversa C18, Lichrospher 5 μ m, Merck). Las fase A (H_2O + ácido trifluoroacético 0,01%) y la fase B (metanol + ácido trifluoroacético 0,01%) se bombearon a flujo constante de 1 mL/min con el siguiente perfil de elución: 0 min 90% de A, 0-5 min 80% de A, 5-45 min 50% de A, 45-55 min 20% de A; a una presión de columna de 60-70 bar. Los datos fueron recogidos y procesados con el programa HSM-7000 (Merck- Hitachi) (Giner *et al.* (1993). La fracción de acetato de etilo, obtenida como se describió en V.4.3., disuelta en agua bidestilada (Cf: 10 mg/mL) fue utilizada para realizar el análisis.

Se utilizaron como compuestos de referencia cafeína (Sigma-Aldrich, USA), isoquercitrina (Extrasynthese, France), ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico y ácido 4,5-di-O-cafeoilquinico (obtenidos como se describe en Góngora *et al.*, 2002). Cada inyección se realizó por triplicado.

V.4.5. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa.

El análisis por cromatografía de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masa (HPLC-ESI-MS) se realizó en los laboratorios del Dr. Dave Watson (Departamento de Ciencias, Universidad de Strathclyde, Reino Unido). El instrumento consistió en un Finnigan LTK Orbitrap controlado mediante el programa Xcalibur version 2.0 (Thermo Fisher, Hemel Hempstead, UK).

La separación cromatografía se realizó en una columna de fase reversa Synergi 4 μ m Hydro-RP (Phenomenex, Reino Unido). La fase A (disolución acuosa de ácido fórmico 0,1 %) y la fase B (acetonitrilo) se bombearon a flujo constante de 0,5 mL/min en gradiente desde 90 % a 60 % de la fase A en 20 min, con un tiempo de equilibrio entre análisis de 2 min.

Para la detección del espectro de masa, la interface de inyección por electrospray (ESI) se configuró de la manera siguiente: la temperatura del capilar se ajustó a 200 $^{\circ}$ C y el flujo de

los gases principal y auxiliar fueron 30 y 10 (unidades arbitrarias del aparato), respectivamente. Los espectros se registraron en modo negativo con rango de escaneo 195–1200 *m/z*.

V.5. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es ampliamente usada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación involucrando ERO.

Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas. Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos.

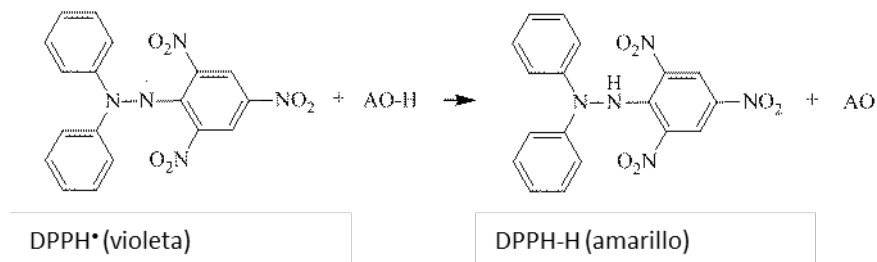
Un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro* no existe debido a que la actividad anti-radicalaria depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. La elección de un sistema químico para generar especies reactivas es un punto crítico en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante con el fin de obtener resultados relevantes (Aruoma, 2003; Prior *et al.*, 2005).

V.5.1. Capacidad antioxidante total

Se han desarrollado varios métodos espectrofotométricos para la determinación del potencial antioxidante de diferentes sistemas bioquímicos. Estos métodos son de rápida aplicación, escasa manipulación de material biológico y baja necesidad de instrumentales, por lo que su aplicación es sencilla. La eficacia antioxidante de las muestras ensayadas se compara con patrones conocidos como ácido ascórbico o Trolox. Estos ensayos se pueden diferenciar por el procedimiento de las reacciones. Algunos utilizan el retraso en la oxidación (fase lag) como parámetro de la actividad antioxidante y otros analizan la capacidad de captación del radical libre o reducción del ión metálico o catión radical hasta alcanzar el estado estacionario (Arnao *et al.*, 1999). Los métodos que se mencionan a continuación son ampliamente usados en diferentes estudios de la capacidad antioxidante de sistemas biológicos (como plasma sanguíneo o tejidos), tanto de extractos y compuestos aislados de especies vegetales como productos derivados de procesos industriales.

V.5.1.1. Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH[•])

El fundamento de esta técnica consiste en la medición de la absorbancia a 517 nm de la reducción del radical estable DPPH[•]. La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (AO-H) u otro radical (R[•]). Es posible, por tanto, cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica de DPPH[•] (Brand-Williams *et al.*, 1995).



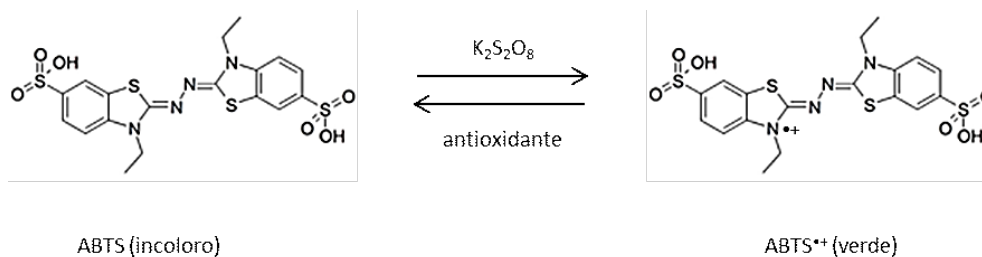
La reacción se inició por la adición de 10 μL de diluciones apropiadas de los extractos o compuesto de referencia (ácido gálico) a 990 μL de la disolución de DPPH[•] (20 mg/mL) en metanol. Tras la incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min, se leyó la absorbancia a 517 nm. CI50 se calculó mediante el análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 4-5 concentraciones diferentes.

V.5.1.2. Reacción con el radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS^{•+})

El método consiste en formar un radical catiónico ABTS^{•+} (cromóforo verde) por la acción oxidativa de peroxidasas u oxidasas sobre ABTS. Una disolución estable de ABTS^{•+} también puede ser preparada con agentes oxidantes, tales como, dióxido de manganeso o persulfato de potasio.

El radical ABTS^{•+} presenta máximos de absorción a 414 nm y en las proximidades del infrarrojo (645, 732 y 815 nm). Esta propiedad posibilita evitar interferencias generadas por cromógenos de la muestra a estudiar.

La estrategia de este método consiste en observar la decoloración del radical ABTS debido a la interacción con especies antioxidantes.

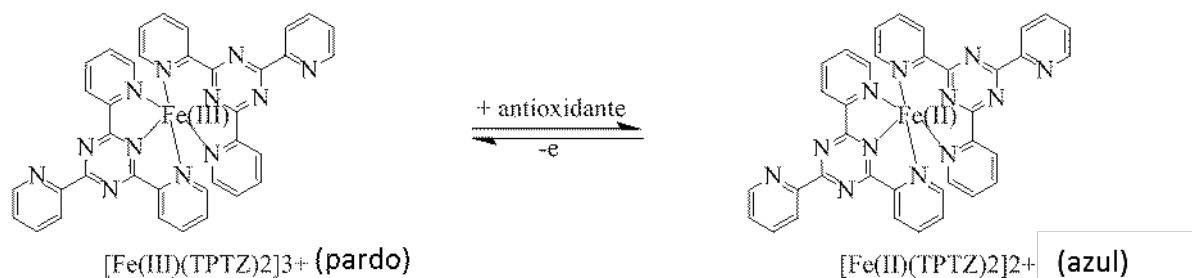


El radical ABTS^{•+} se produjo utilizando una mezcla de reacción que contenía ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2,45 mM) en tampón fosfato pH 7,0. La mezcla de reacción se preparó 12 h antes de su uso y se mantuvo a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Se ajustó la absorbancia de la disolución de ABTS^{•+} a 0,7 unidades a 732 nm con tampón fosfato pH 7,0 (Pannala *et al.*, 2001).

La reacción se inició por la adición de 10 µL de diluciones apropiadas de extracto o compuesto de referencia (ácido gálico) a 990 µL de la disolución de ABTS^{•+}. Tras incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min, se leyó la absorbancia a 732 nm. La CI50 se calculó mediante el análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 4-5 concentraciones diferentes.

V.5.1.4. Determinación de la actividad reductora de Fe⁺³ - Ensayo FRAP

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el Fe³⁺ presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe²⁺), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (Benzie & Strain, 1996).



Originariamente este método se lo denominó “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP) y fue utilizado para medir la actividad antioxidante del plasma humano. Actualmente se lo denomina “Ferric reducing /antioxidant power” y su uso se ha extendido al estudio de diferentes compuestos, mezclas o extractos biológicos.

El reactivo para este ensayo se preparó en el momento y consistió en una mezcla de 25 mL de tampón ácido acético-acetato de sodio (300 mM, pH 3,4), 2,5 mL de TPTZ (10 mM disuelto en 40 mM de HCl) y 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM).

La reacción reductora de Fe⁺³ se inició por la adición de 10 µL de diluciones apropiadas de los extractos o compuesto de referencia (ácido ascórbico) a 990 µL de la disolución de reactivo. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se midió la absorbancia de la mezcla a 590 nm. Los resultados obtenidos se expresan como mg EQ ácido ascórbico/mg de extracto.

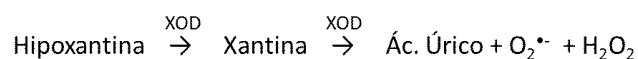
V.5.2. Actividad atrapadora de ERO

V.5.2.1. Radical superóxido: sistema hipoxantina/xantina oxidasa/azul de nitrotetrazolio

El radical superóxido (O₂^{•-}) es el primer producto de la reducción univalente del oxígeno. Es el único radical del cual se puede formar la mayoría de las especies reactivas de oxígeno y puede dismutar espontáneamente o enzimáticamente produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno.

Actúa fundamentalmente como un agente reductor donando su electrón extra. Su reactividad química es alta en solventes orgánicos, aunque es poco reactivo en disoluciones acuosas, lo que le permite difundir lejos de su lugar de formación, reaccionando con otras estructuras dentro de la célula comprometiendo la funcionalidad de la misma. Ataca moléculas como el ADN, fosfolípidos de la membrana, polisacáridos, tioles y aminas. Aunque debe pensarse que la mayoría de sus efectos dañinos derivan de su capacidad para generar radicales altamente tóxicos como el radical hidroxilo (reacción de Haber-Weiss), también se ha implicado en el inicio y terminación de la peroxidación lipídica.

La xantina oxidasa (XOD) es capaz de generar O₂^{•-} *in vivo* por la oxidación de los productos que provienen del catabolismo de las bases púricas. Esta enzima cataliza las siguientes reacciones de oxidación:



El O₂^{•-} generado en esta secuencia de reacciones, debido a su carácter reductor, puede reducir compuestos como el azul de nitrotetrazolio (NBT), dando lugar a la formación de un cromóforo (formazán) que presenta un máximo de absorción a 560 nm. Aquellos compuestos captadores de O₂^{•-} disminuirán la velocidad de formación de dicho cromóforo. También,

resulta necesario descartar una posible interferencia del compuesto con la enzima mediante una modificación del ensayo. De igual manera, determinar si el mismo compuesto puede comportarse como directo reductor del NTB.

Este método es altamente sensible y aunque el NBT no es reducido de modo específico por el $O_2^{\bullet-}$, no es fácilmente reducible por compuestos fenólicos, por lo que resulta un método de elección cuando se evalúan muestras que contienen este tipo de compuestos, especialmente con sustitución catecol.

Conforme al protocolo seguido (Schinella *et al.*, 2000) la mezcla de reacción (volumen total de 1 mL, en cubeta de plástico o vidrio) contenía 680 μ L de tampón KH_2PO_4 -KOH (50 mM, pH 7,4), 10 μ L de hipoxantina 10 mM (Cf= 100 μ M), 100 μ L $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 10 mM (Cf= 1 mM), 100 μ L de NBT 1 mM (Cf= 100 μ M) y 10 μ L de diluciones apropiadas de extracto, vehículo o compuesto de referencia (ácido gálico). Tras agitar la mezcla se la dispuso en la celda espectrofotométrica y se inició la reacción con la adición de 100 μ L xantina oxidasa (Cf= 0,06 UI/mL), diluida recientemente en el tampón utilizado e inmediatamente se realizó la determinación cinética de la variación de la absorbancia a 560 nm durante 3 min. La CI50 se calculó mediante el análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 4-5 concentraciones diferentes.

Según las condiciones experimentales el grupo control presentó el máximo de $O_2^{\bullet-}$ generado durante la reacción. Se ensayaron blancos de la reacción, en los que no se adicionó la XOD para comprobar que no exista reducción espontánea del NBT y, también se ensayaron blancos (sin XOD y sin NBT) a fin de descartar una posible interferencia de nuestro producto en estudio con el sistema detector.

Inhibición de xantina oxidasa: atendiendo a que los productos inhibidores de la actividad de la enzima xantina oxidasa producirían una disminución en la generación de $O_2^{\bullet-}$ en este sistema la reducción de NBT sería menor que en los controles. Así pues, fue necesario comprobar si nuestros extractos actuaban a este nivel. Como ya se mencionó, esta enzima cataliza la oxidación de las bases xánticas a ácido úrico, cuyo máximo de absorción se encuentra a 295 nm, lo que permite hacer un seguimiento espectrofotométrico de la reacción.

Para ello, se introdujo en una cubeta de reacción 100 μ L de xantina oxidasa (Cf= 0,06 UI/mL) y 10 μ L de la muestra a ensayar, vehículo o compuesto de referencia (alopurinol, Sigma-Aldrich, USA). Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, transcurrido dicho tiempo se añadieron 780 μ L de tampón KH_2PO_4 -KOH (50 mM, pH 7,4), 100 μ L $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$

(Cf= 1 mM) y 10 μ L xantina (Cf= 100 μ M). A continuación se midió la absorbancia a 295 nm durante dos minutos.

V.5.2.2. Radical hidroxilo: sistema H_2O_2/Fe^{3+} -EDTA/ascorbato

Entre las especies derivadas del oxígeno, el radical hidroxilo (HO^\bullet) es uno de los más inestables y reactivos. El mismo está dotado de un gran poder oxidante y es capaz de reaccionar con numerosas moléculas tales como azúcares, nucleótidos, aminoácidos, ácidos orgánicos, etcétera. Esta reacción se la relaciona con el desarrollo de procesos mutagénicos y el envejecimiento celular (Valko *et al.*, 2007).

La técnica para generar los radicales hidroxilos está basada en la reacción del hierro (II) con el peróxido de hidrógeno, reacción de Fenton:



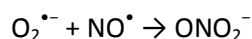
Esta reacción se favorece en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico, los cuales regeneran el hierro en su estado reducido. El HO^\bullet generado degrada la 2-desoxirribosa presente en el medio, dando lugar a una mezcla de productos que reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para dar un cromóforo con un máximo de absorción a 532 nm (Halliwell *et al.*, 1987).

La mezcla de reacción ensayada contenía en tampón $KHPO_4$ -KOH (10 mM, pH 7,4), 10 μ L de ascorbato (Cf= 50 μ M), 50 μ L de $FeCl_3$ (Cf= 20 μ M) disuelto en $EDTANa_2 \cdot 2H_2O$ (2 mM), 50 μ L de H_2O_2 (Cf= 1,42 mM), 10 μ L del producto a ensayar (Cf= 100 μ g/mL) o vehículo y 100 μ L de desoxirribosa (Cf= 2,8 mM) en un volumen final de 1 mL. Las disoluciones de ascorbato, peróxido de hidrogeno y desoxirribosa se hicieron en el tampón fosfato. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 60 min, tras los cuales se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético (2,8 %P/V) y 1 mL de TBA (1 %P/V). Se calentó en baño de agua a 90 °C durante 20 min y tras enfriar se midió la absorbancia a 532 nm. Se realizaron tubos blanco y controles. Este ensayo también se realizó en ausencia de ascorbato con el fin de estudiar el posible efecto prooxidante de los extractos ensayados. Como compuesto de referencia se utilizó DMSO (Cf= 20 mM; Sigma-Aldrich, USA).

Los resultados se expresaron como unidades de Abs a 532 nm producidas por las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRTBA) generados por la degradación de la desoxirribosa.

V.5.2.3. Actividad atrapadora de peroxinitrito

El peroxinitrito (ONO_2^-) es un agente oxidante y nitrante. Debido a sus propiedades oxidantes, el ONO_2^- puede dañar una gran variedad de moléculas en las células, incluyendo el ADN y las proteínas. La formación de ONO_2^- *in vivo* ha sido asociada a la reacción del radical libre superóxido con el radical libre NO:



El emparejamiento resultante de estos dos radicales libres resulta en ONO_2^- , una molécula que en sí misma no es un radical libre, pero que es un poderoso oxidante. El ONO_2^- reacciona como nucleófilo con el dióxido de carbono. *In vivo*, su reacción con dióxido de carbono ocurre rápidamente formando nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), a partir del cual se generan diferentes compuestos de gran capacidad oxidante y nitrosante que provocan daño celular relacionado a ONO_2^- .

V.5.2.3.1. Síntesis del peroxinitrito (Schinella et al., 2010)

El ONO_2^- se sintetizó haciendo reaccionar nitrito de sodio con peróxido de hidrógeno acidificado con HCl 1,0 M y NaOH 1,0 M. Luego, se trató con dióxido de manganeso, para eliminar el peróxido de hidrógeno residual. Todo el ensayo se llevó a cabo en baño agua/hielo. La disolución de ONO_2^- se centrifugó a 10000 x g durante 20 min, donde se eliminó el exceso de dióxido de manganeso. El sobrenadante se conservó en el congelador (-18 °C) para el uso posterior. Su concentración se determinó espectrofotométricamente a 302 nm utilizando el coeficiente de extinción ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

V.5.2.3.2. Ensayo de decoloración del rojo de pirogalol (Balavoine & Geletii, 1999)

El ensayo de decoloración del rojo de pirogalol se llevó a cabo en una disolución tampón de fosfato de potasio (50 mM, pH 7,0), donde se mezcló con rojo de pirogalol (Cf= 60 μM), diluciones apropiadas del extracto o compuesto de referencia (ácido ascórbico), en ausencia o presencia de bicarbonato de sodio (Cf= 25 mM). La reacción se inició con el agregado de ONO_2^- (Cf= 60 μM). Se determinó la absorbancia a 542 nm. Se realizó una curva estándar utilizando ácido ascórbico. La Cl_{50} se calculó mediante el análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 4-5 concentraciones diferentes.

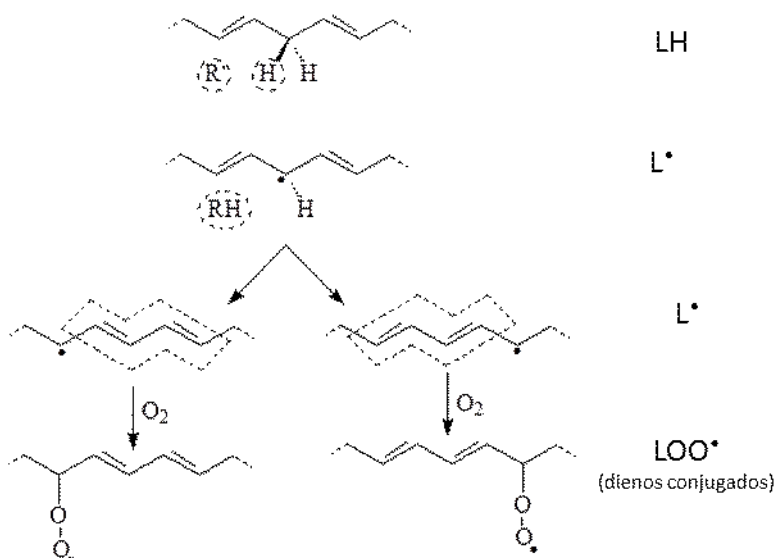
V.5.2.3.3. Nitración de albumina sérica bovina

La reacción entre ONO_2^- y albúmina sérica bovina (ASB) se llevó a cabo de acuerdo a la descripción de Jiao *et al.* (2001). Brevemente, se mezclaron a temperatura ambiente la ABS (Cf= 1 mg/mL), las diluciones apropiadas del extracto y ONO_2^- (Cf= 2 mM) en disolución tampón de fosfato de potasio (150 mM; pH 7,2), en ausencia o presencia de bicarbonato de sodio (Cf= 25 mM). Las muestras de control positivo y aquellas tratadas con los extractos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, 10%), siguiendo el método de Laemmli (1970). La nitración de ASB fue examinada por Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (Cayman Chemicals, USA). Las bandas se visualizaron con un sistema de detección de quimioluminiscencia ECL-Plus y se captaron imágenes utilizando el software Scion Image (Scion Co., USA).

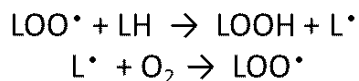
V.5.3. Inhibición de la peroxidación lipídica

V.5.3.1. Inhibición de la peroxidación lipídica microsomal

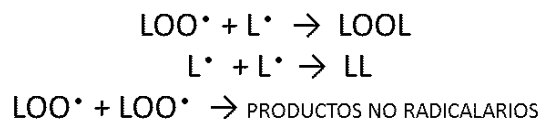
La peroxidación lipídica es un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (LH). Estas reacciones en cadena se inician debido a la facilidad con que algunos radicales libres (R^\bullet) son capaces de sustraer un hidrógeno del grupo metileno presente entre dos insaturaciones, dando lugar a múltiples estructuras resonantes de los radicales formados (L^\bullet). En la mayoría de los casos, la propagación ocurre debido a la rápida reacción de estas formas resonantes con el oxígeno molecular que conduce a la formación de radicales lipoperóxidos (LOO^\bullet) reorganizados con dobles enlaces conjugados.



Este radical puede de nuevo sustraer un hidrógeno de un LH para formar un hidroperóxido (LOOH) y un segundo radical L[•], el cual vuelve a reaccionar con el oxígeno molecular regenerando un nuevo radical lipoperóxido, propagando de esta manera el proceso.



La fase de terminación ocurre cuando dos radicales libres reaccionan entre sí, o bien, cuando el radical reacciona con una sustancia donadora de átomos de hidrógeno (llamada antioxidante, reductor o captador de radicales libres), dando lugar a productos inactivos (Hogg & Kalyanaraman 1999).



Como productos finales del proceso se pueden encontrar compuestos tales como hidroperóxidos, hidroxiácidos grasos, epoxiácidos grasos, aldehídos poliinsaturados, hidroxialdehídos, dialdehídos, cetonas y otros; que pueden reaccionar con grupos amino de proteínas, fosfolípidos o ácidos nucleicos, comprometiendo el buen funcionamiento de las células y tejidos que los contienen.

En esta tesis, el daño oxidativo de la membrana microsomal y de las lipoproteínas plasmáticas se determinó cuantificando uno de los productos formados en este proceso, el malonildialdehído (MDA), que tiene la capacidad de formar aductos coloreados (rosa) con el TBA con un máximo de absorción a 532 nm.

V.5.3.1.1. Preparación de microsomas hepáticos de rata (Schinella *et al.*, 2000)

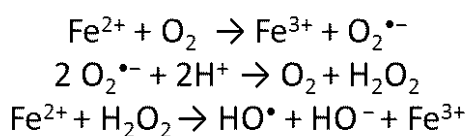
Se utilizaron ratas Wistar macho (200-250 g) mantenidas en ayuno desde el día anterior (12 h). Los animales fueron sacrificados y los hígados rápidamente extirpados y colocados en disolución tampón fosfato 10 mM, pH 7,4, conteniendo 11,5 g/L de KCl a 0 °C, sobre hielo. Los órganos fueron pesados, cortados en trozos y lavados tres veces con disolución tampón a 0 °C. Se homogeneizaron con un homogenizador Polytron® en disolución tampón a 0 °C en proporción 1:3 (P/V). Se centrifugaron a 12000 x g durante 30 min a 4°C.

El sobrenadante obtenido se centrifugó a 100000 x g durante 60 min. Luego, se recogió el precipitado y se lo homogenizó nuevamente con tampón en una proporción tal, de modo

que se obtengan tantos mL como peso inicial de hígado. Se fraccionaron alícuotas de 2-3 mL y se conservaron a -70°C , para ser usados dentro de los dos meses siguientes. La determinación del contenido proteico se realizó mediante el método de Lowry (1951).

V.5.3.1.2. Peroxidación lipídica no enzimática: sistema Fe^{2+} /ascorbato (Schinella *et al.*, 2000)

La generación no enzimática de HO^{\bullet} puede ocurrir a partir de la reducción univalente del oxígeno en presencia Fe^{2+} y la posterior dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$, haciendo que la reacción del H_2O_2 con el Fe^{2+} remanente promueva la formación de radical HO^{\bullet} (reacción de Haber-Weiss), que iniciará la peroxidación lipídica de las membranas microsomales.



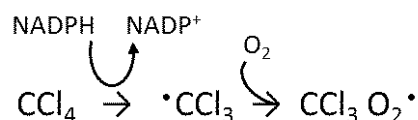
En este sistema, la mezcla Fe^{2+} /ascorbato se comporta como un catalizador de la peroxidación lipídica, ya que el ión ferroso que pasa a estado férrico durante el proceso es reducido nuevamente por el ascorbato.

Para un volumen final de 1 mL, se tomaron 0,9 mL de la suspensión microsomal diluída (2 mg/mL) en una disolución 1:2 V/V de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) y KCl 1,12 % en presencia diluciones apropiadas del extracto o compuesto de referencia (BHT, Sigma-Aldrich, USA). La peroxidación lipídica fue inducida por la adición de 50 μL de ascorbato (Cf= 10 mM) y 50 μL de FeSO_4 (Cf= 100 μM). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 20 min. La reacción se detuvo tras la adición de 1 mL de una disolución de ácido tricloroacético (10 %P/V), manteniéndose en baño agua/hielo durante 10 min. Tras centrifugar durante 10 min a $3000 \times g$ y 4°C se tomó 1 mL del sobrenadante y se le añadió 1 mL TBA (0,7 %P/V). Los tubos fueron calentados en baño de agua a 90°C durante 30 min y finalmente, tras ser enfriados se midió la absorbancia a 532 nm. La Cl_{50} se calculó mediante el análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 4-5 concentraciones diferentes.

En cada ensayo se prepararon un tubo control (con vehículo) donde la absorbancia fue la máxima puesto que es donde mayor peroxidación lipídica se produjo, un tubo blanco para conocer el grado de peroxidación espontánea del material lipídico en ausencia del inductor y un tubo de la muestra a ensayar como blanco de color.

V.5.3.1.3. Peroxidación lipídica enzimática: sistema $\text{CCl}_4/\text{NADPH}$ (Schinella *et al.*, 2000)

El sistema citocromo P450 presente en la membrana de los microsomas hepáticos es activado por la adición de NADPH. Como consecuencia de esto el CCl_4 añadido es transformado en una especie radicalaria muy reactiva, como es el radical triclorometilperoxilo, que inicia la peroxidación lipídica.



Para realizar la experiencia se tomaron 880 μL de la disolución generadora de NADPH, compuesta por NADP^+ (Cf = 0,2 mM), glucosa-6-fosfato (Cf = 4 mM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Cf = 0,6 U/mL) en una disolución formada por 18 mL de KCl (0,15 M), 12 mL de tampón Tris-HCl (0,1 M, pH = 7,4) y 8 mL de H_2O , todo ello ajustado a un pH de 7,4. Posteriormente se adicionaron 10 μL de diluciones apropiadas del extracto o compuesto de referencia (BHT), 10 μL de CCl_4 disuelto en DMSO (1:4 P/V) y tras la adición 100 μL de la suspensión microsomal (Cf= 1,5 mg/mL) se agitaron y se incubaron los tubos a 37°C durante 15 min. La peroxidación fue detenida por la adición de ácido tricloroacético (10 %P/V), manteniendo los tubos en agua/hielo durante 10 min. Tras centrifugar a 3000 x g, durante 10 min a 4 °C, se procedió como en el protocolo anterior.

Al igual que en el sistema Fe^{2+} /ascorbato, se prepararon un tubo control (con vehículo) que presentó el máximo de absorción, un tubo muestra y los respectivos blancos. En estos últimos tubos se midió el grado de peroxidación inducida exclusivamente por el NADPH presente en el medio de reacción en ausencia de CCl_4 .

Inhibición de anilina hidroxilasa (CYP2E1): atendiendo a que los productos inhibidores de las isoenzimas del citocromo P450 pueden generar una disminución en la peroxidación lipídica generada por este sistema, resultó necesario comprobar si nuestros extractos actuaban a este nivel.

La actividad de la CYP2E1, que es la principal isoenzima responsable de la biotransformación hepática del CCl_4 , se determinó según lo descrito por Inder *et al.* (1999). La mezcla de reacción, en un volumen de 1 mL, se formó con extracto (Cf= 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), proteína microsomal (1 mg), anilina-HCl (80 mM), sistema generador de NADPH, en una disolución tampón Tris-HCl (50 mM, pH = 7,4). Se incubó durante 20 min a 37 °C y la reacción se detuvo por la adición de 0,5 mL de ácido tricloroacético al 20 %P/V. Después de la centrifugación a

3000 x *g* durante 10 min, se determinó la cantidad de *p*-aminofenol formado mezclando 1 mL de sobrenadante, 0,5 mL de Na₂CO₃ al 10 %P/V y 1 mL de fenol al 2 %P/V en NaOH (0,2N). Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se midió la absorbancia a 630 nm.

V.5.3.2. Inhibición de la peroxidación lipídica de lipoproteínas

En la actualidad, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica y existe una gran cantidad de evidencia respecto a que las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas de baja densidad plasmáticas (LDL) aumentan sus propiedades proaterogénicas, interviniendo en la etapa inicial de la formación de la lesión aterosclerótica (Gaut & Heinecke, 2001). Los antioxidantes capaces de disminuir la susceptibilidad a la oxidación de LDL serían adecuados para la reducción de la aterogénesis temprana o relentizar la progresión de la enfermedad.

V.5.3.2.1. Aislamiento de las LDL (Vieira *et al.*, 1996)

Se recogió sangre de donantes sanos después de un ayuno de 12 h utilizando EDTA como anticoagulante. El plasma fue obtenido por centrifugación a 3000 x *g* durante 15 min a 15 °C y se ajustó a una densidad de 1,21 g/mL con KBr. En tubos de centrifuga de policarbonato de 10 mL se preparó un gradiente de densidad discontinuo colocando en el fondo del tubo 2,8 mL del plasma con densidad ajustada y por encima 6,6 mL de un tampón 10 mM PBS -1mM EDTA, pH 7,4. Los tubos se ultracentrifugaron utilizando un equipo Beckman L 80 (Beckman Coulter, Inc., USA) con un rotor de ángulo fijo 70.1 Ti a 65000 rpm durante 3 h a 15 °C. Después de la centrifugación, los tubos fueron cuidadosamente sacados del rotor y puestos en posición vertical. La fracción amarillo-anaranjada que queda en la fracción de mitad superior del tubo corresponde a las LDL. La fracción de las LDL se recogió por succión utilizando una pipeta Pasteur y se dializó exhaustivamente frente a PBS (pH 7,4 sin EDTA) en la oscuridad, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se almacenó a 4 °C en atmósfera de nitrógeno.

V.5.3.2.2. Oxidación de las LDL (Schinella *et al.*, 2007)

Las LDL se oxidaron utilizando el método clásico de la auto-oxidación inducida por Cu²⁺. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C para la medición de la formación de dienos conjugados y la producción de SRTBA durante diferentes tiempos hasta 3 h. Crecientes concentraciones de los extractos (2 – 30 µg/mL) se colocaron en el medio de incubación. El probucol (Sigma-Aldrich, USA) se utilizó como un control positivo.

La cinética de formación de dienos conjugados se determinó como fue descrita por Schinella *et al.* (1996). Las LDL (Cf= 100 µg/mL de colesterol total) se incubaron en PBS en presencia de CuSO₄ (10 µM). La determinación de dienos conjugados se realizó por medición continua de absorción a 234 nm usando un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Beckman Coulter, Inc., USA) con los registros a intervalos de 15 min. Los resultados fueron expresados como incremento en la absorbancia por encima del valor inicial.

A las 3 h de incubación, la oxidación se detuvo por adición de EDTA (Cf= 100 µM), con el fin de medir la producción de SRTBA. Los productos de oxidación se determinaron por el método del TBA, descrito anteriormente. Los resultados se expresaron como % de inhibición de la peroxidación lipídica respecto al control negativo.

V.5.3.2.3. Cambio de movilidad electroforética de las LDL (Schinella *et al.*, 2007)

La movilidad electroforética de las LDL natural y oxidadas se evaluó en gel de agarosa 1% utilizando tampón Tris-glicina, pH 8,6. La electroforesis se llevó a cabo utilizando una cubeta submarina Hoefer SE 3 (Amersham Biosciences, USA). Cada carril se cargó con 10 µL de las preparaciones de LDL. Después de ejecutar los gels se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

V.5.3.3. Peroxidación lipídica de plasma humano (Schinella *et al.*, 2007)

El plasma humano se obtuvo de sangre heparinizada de donantes sanos normolipidémicos, 100 µL de plasma (200 ± 20 µg colesterol total) se diluyó con 350 µL de PBS y la oxidación se inició por el agregado de 50 µL CuSO₄ (10 mM) en presencia (100 µg/mL) y ausencia de los extractos. Después de 6 h de incubación a 37°C la reacción se detuvo con el agregado de EDTA (100 mM, 50 µL). Se determinó el contenido de SRTBA que se expresó como nmol MDA formados en las condiciones del ensayo usando su coeficiente de extinción ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

V.5.4. Actividad quelante de ión ferroso (Fe²⁺)

La capacidad quelante del ión Fe²⁺ de los extractos se determinó según el método desarrollado por Lopes *et al.* (1994). El contenido de Fe²⁺ se midió por la formación de complejo de hierro ferroso - ferrozina a 562 nm.

La disolución acuosa del extracto (Cf= 100 µg/mL) se mezcló con 2 mM de FeCl₂ y 5 mM de ferrozina en una proporción de 10:0,1:0,2. La mezcla se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Se midió la absorbancia de la disolución resultante a

562 nm. Cuanto menor es la absorbancia de la mezcla de reacción más alta es la capacidad quelante de Fe^{2+} . EDTA (Sigma-Aldrich, USA) se utilizó como una referencia.

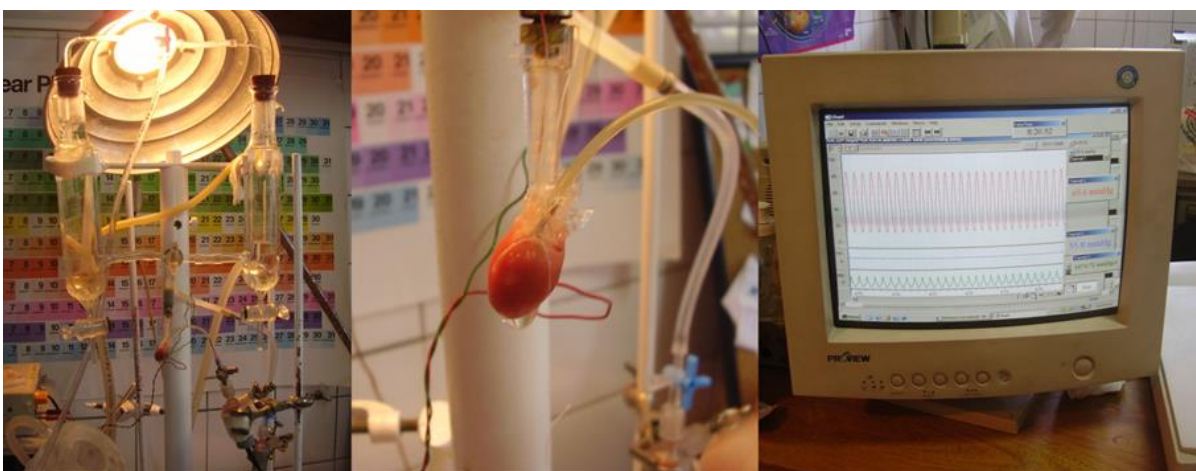
V.6. Fisiopatología del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión (Lopera *et al.*, 2013)

V.6.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos normotensas de 5 a 6 meses de edad obtenidas del bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicado por el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos (publicación nro. 85-23, revisada en el año 1996).

V.6.2. Obtención del corazón aislado

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). Se les abrió rápidamente el tórax, se aisló la aorta y se cortaron las conexiones cardíacas liberando al corazón de grasa y tejido conectivo, sacándolo del animal. La aorta se ligó con hilo de lino a una cánula colocada en un sistema de perfusión de Langendorff. Estas maniobras se realizaron en un tiempo no mayor de 60 seg para evitar el deterioro del preparado. La composición del Ringer fue: NaCl 120 mM; CaCl_2 1,35 mM; KCl 4,7 mM; MgSO_4 1,2 mM; NaCO_3H 20 mM y dextrosa 11,1 mM, el cual fue termostatizado a 37 °C y equilibrado con una mezcla gaseosa de 95% O_2 - 5% CO_2 , para obtener un valor de pH de aproximadamente 7,40.



Sistema de perfusión de Langendorff

Corazón aislado de rata perfundido y estimulado eléctricamente.

Programa de adquisición de datos Chart V4.2.3 ADInstruments

V.6.3. Perfusión de corazones aislados de rata

Luego de un breve período de estabilización, se produjo el bloqueo aurículo-ventricular dañando con una fina aguja el tejido conductivo del septum auricular. La estimulación eléctrica se realizó a través de dos electrodos que fueron suturados a la pared ventricular derecha para mantener la frecuencia cardíaca constante en un valor de 280 ± 10 latidos/min. Con la finalidad de evaluar la actividad mecánica de los corazones se colocó un balón de látex atado a un tubo de polietileno en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral. El extremo opuesto del tubo fue conectado a un transductor de presión (Statham P23XL, USA) que permitió medir la presión del ventrículo izquierdo (PVI). El globo de látex y el tubo de polietileno se llenaron con un volumen de agua suficiente para lograr una presión diastólica final en ventrículo izquierdo (LVEDP) de entre 8-12 mmHg. Este volumen se mantuvo constante durante todo el experimento. La presión de perfusión coronaria fue monitoreada en el punto de canulación de la aorta y ajustada a aproximadamente entre 60-70 mmHg. El flujo coronario fue controlado por una bomba peristáltica entre 10-12 mL/min. La PVI fue adquirida usando un conversor analógico-digital y el programa de adquisición Chart V4.2.3 (ADInstruments, USA). A través de esta señal se obtuvieron los parámetros mecánicos necesarios para evaluar la función miocárdica.

V.6.4. Protocolo experimental

Después de 20 min de estabilización, se realizaron los siguientes protocolos experimentales:

a) Grupo control isquémico (C)

Los corazones ($n = 6$) se sometieron a 20 min de isquemia global normotérmica seguido por 30 min de reperfusión. La isquemia fue inducida por detención del flujo de entrada de la disolución Ringer y el corazón se colocó en una camarita para mantener la temperatura en 37 °C.

b) Grupos tratados con extractos

Los corazones ($n = 6$) fueron tratados 10 min antes de la isquemia y en los primeros 10 min de reperfusión con una concentración 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos acuosos liofilizados de *I. brasiliensis* (B) e *I. paraguariensis* (P) en la disolución Ringer. El tiempo de administración se seleccionó teniendo en cuenta que el daño miocárdico es el resultado de alteraciones que se producen durante la isquemia y los primeros minutos de la reperfusión.

En concordancia con los objetivos trazados, para evaluar la participación del NO, otros corazones (n = 4) fueron tratados con 1 mM de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, inhibidor no selectivo de NOS) durante los períodos de isquemia y reperfusión, para prevenir la activación de las diferentes isoformas de NOS.

V.6.5. Evaluación de la función miocárdica

La función miocárdica fue evaluada a través de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP), obtenida restando el valor de LVDEP a la PVI, la máxima velocidad de ascenso de la PVI (+dP/dt_{max}) y la máxima velocidad de descenso de la PVI (-dP/dt_{max}). La rigidez miocárdica durante la reperfusión y la contractura isquémica fueron evaluadas a través de la LVEDP.

V.6.6. Evaluación del daño oxidativo miocárdico

Al final de la reperfusión, los corazones fueron congelados en N₂ líquido y guardados a -70 °C. Para la evaluación del daño oxidativo, los corazones fueron homogenizados en una disolución 25mM KH₂PO₄-140 mM KCl (pH = 7,4) en una relación 1:4 P/V con un homogenizador Polytron®. Las muestras fueron centrifugadas a 500 x g durante 30 min a 4°C. En el sobrenadante se realizaron los siguientes ensayos.

V.6.6.1. Peroxidación lipídica

La mezcla de reacción contiene 250 µL de sobrenadante, 250 µL de agua destilada, 750 µL de ácido tricloroacético (10 %P/V) y 500 µL de TBA (0,7%P/V). Los tubos fueron calentados en baño de agua a 90°C durante 30 min, luego se enfriaron en baño agua/hielo y se centrifugaron a 3000 x g a 4°C durante 15 min. En el sobrenadante se determinó la absorbancia a 532 nm. El contenido de SRTBA fue expresado como nmol MDA/g tejido usando su coeficiente de extinción ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

V.6.6.2. Contenido de glutatión reducido

Alícuotas del sobrenadante de homogenato se desproteinizaron utilizando ácido tricloroacético (Cf= 5 %P/V). En la fracción libre de proteínas se determinó la presencia de grupos sulfhidrilos mediante el reactivo de Ellman (DTNB; ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico). La mezcla de reacción fue compuesta por 300 µL de sobrenadante desproteinizado, 200 µL de ácido tricloroacético (5 %P/V), 1 mL de tampón Tris-HCl (0,8 M; pH 8,9) y 25 µL de DTNB (10 mM, en metanol). Tras 5 min a temperatura ambiente, se midió la

absorbancia a 414 nm. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g GSH/g tejido}$ y la curva de calibración se determinó con glutatión reducido (Sigma-Aldrich, USA).

V.7. Análisis estadístico

Los datos se registraron en una base de datos Excel® (Microsoft, USA). Luego se procesaron mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, USA) para Microsoft Windows®.

La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se calculó mediante el análisis de regresión de la gráfica concentración/respuesta, obtenida de 4-5 concentraciones diferentes. Estos resultados se expresaron como media aritmética y el intervalo de confianza 95%.

Los restantes resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados usando el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativos.

VI. Resultados

VI.1. Caracteres morfoanatómicos de las hojas de *Ilex brasiliensis*

La presente investigación tuvo por finalidad establecer los caracteres histológicos de diagnóstico presentes en las hojas de *I. brasiliensis* y compararlos con los obtenidos por Spegazzini *et al.* (2002) con *I. paraguariensis*.

En cuanto a los caracteres anatómicos foliares de *I. brasiliensis*, observados por microscopía óptica, se advierte una estructura dorsiventral o bifacial, constituida por un parénquima en empalizada con células dispuestas en 1 o 2 capas hacia la epidermis adaxial y un parénquima lagunoso braciforme hacia la epidermis abaxial donde se disponen las drusas (Figura 7A).

Ambas epidermis son uniestratificadas, con células de contornos levemente ondulados y cubiertas por una gruesa cutícula (Figura 7, A y B); la epidermis adaxial incluye idioblastos mucilaginosos y la epidermis abaxial incluye hidátodos y estomas de tipo anisocíticos y ciclocíticos (Figura 7B).

El haz vascular de la vena central de la hoja es de tipo colateral, caracterizado por el xilema que está localizado en el lado adaxial mientras que el floema se ubica en el abaxial. El esclerénquima se dispone del lado abaxial del haz como una banda semilunar (Figura 7 A).

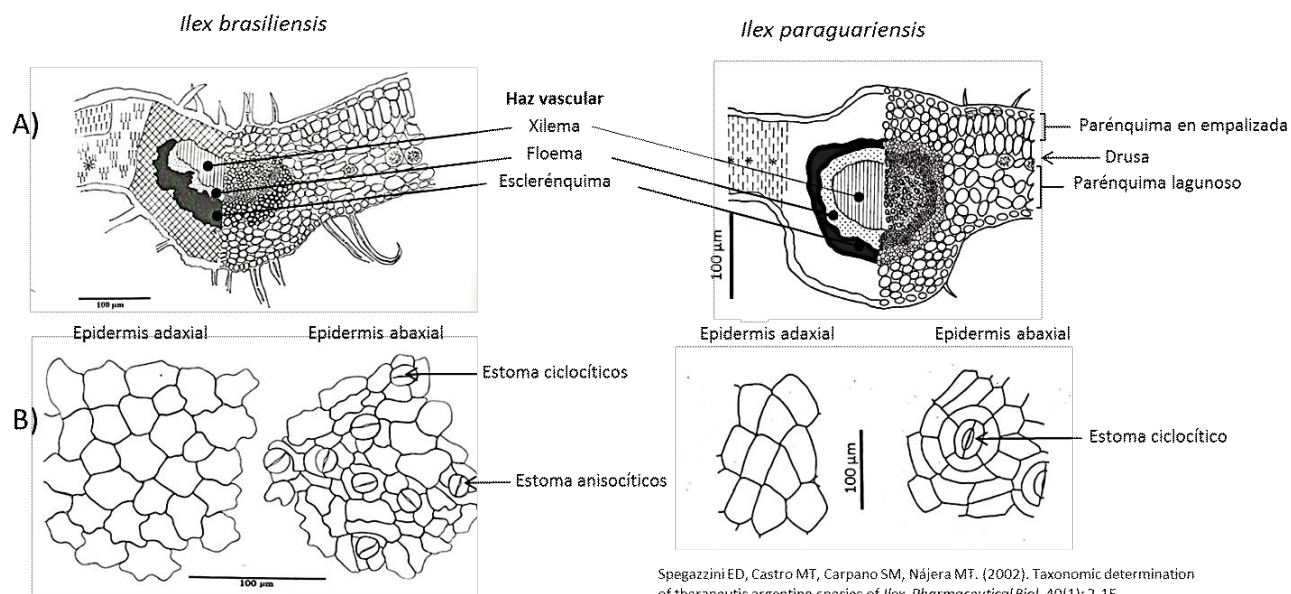


Figura 7. Microscopía óptica de hojas de *I. brasiliensis*
A) Corte transversal y B) vista superficial

En el estudio de las hojas de *I. brasiliensis* con MEB se observaron abundantes tricomas tectores unicelulares en ambas epidermis y en la epidermis abaxial una abundante densidad de estomas (Figura 8).

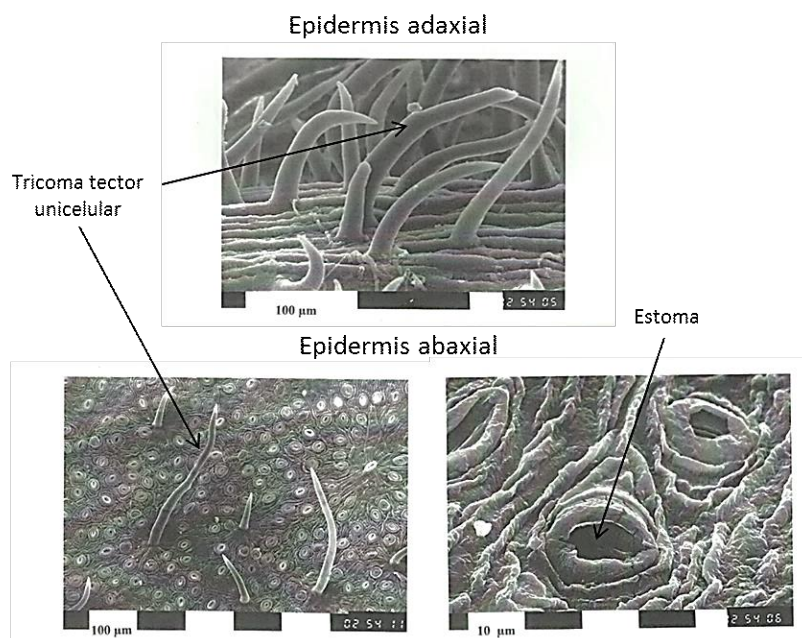


Figura 8. Microscopia electrónica de barrido de hojas de *I. brasiliensis*

En la Tabla 3 se pueden observar los caracteres anatómicos y valores cuantitativos que permiten la diferenciación entre *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis*.

Tabla 3. Caracteres histológicos y magnitudes proporcionales de hojas de *I. brasiliensis*

Caracteres	<i>I. brasiliensis</i>	<i>I. paraguariensis</i>
Estomas	anisocíticos y ciclocíticos	ciclocíticos
Nº de hileras de parénquima en empalizada	1-2	3
Posición de las drusas en el mesófilo	parénquima lagunoso	3er hilera del parénquima en empalizada
Sistema vascular	Haz colateral abierto (banda semilunar de esclerénquima)	Haz perifloemático o anficribal (banda completa de esclerénquima)
Índice de estomas	14,14 (16,36) 17,17	6,90 (10,13) 15,50*
Índice de empalizada	4,00 (6,16) 7,75	2,50 (3,00) 4,50*

Los valores de los índices de estomas y empalizada se expresan en rangos y (promedio). *P<0,05 respecto a *I. brasiliensis*.

VI.2. Composición química del extracto acuoso de *Ilex brasiliensis*

VI.2.1. Determinación de fenoles totales y ácido ascórbico

En la Tabla 4 se puede observar que los contenidos de fenoles totales y ácido ascórbico del extracto de *I. brasiliensis* fueron mayores respecto a *I. paraguariensis*.

Tabla 4. Contenido de ácido ascórbico y fenoles totales del extracto acuoso de *Ilex brasiliensis*

	Ácido Ascórbico ^{a)}	Fenoles totales ^{b)}
<i>Ilex brasiliensis</i>	24	156
<i>Ilex paraguariensis</i>	11	111

a) mg de ácido ascórbico / g extracto; b) mg EQ de ácido gálico / g extracto

VI.2.2. Análisis por cromatografía en capa fina: revelado con DPPH*

La Figura 9 muestra los resultados de la aplicación de la CCF para el análisis del extracto de acetato de etilo de la infusión de *I. brasiliensis*. Este análisis se realizó con el fin de caracterizar compuestos fenólicos, en especial flavonoles y derivados cafeoilquínicos, que se revelaron por su capacidad de decolorar DPPH*. Se observa que ambos extractos exhiben 4 bandas comunes entre Rf: 0,30 y 0,90. Las bandas (Rf: 0,88; 0,80 y 0,33) son coincidentes con los compuestos de referencia, ácido cafeico, ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico y rutina, respectivamente. El extracto de *I. brasiliensis* presenta una banda extra intensa a Rf: 0,53 que se corresponde con la referencia de isoquercitrina.

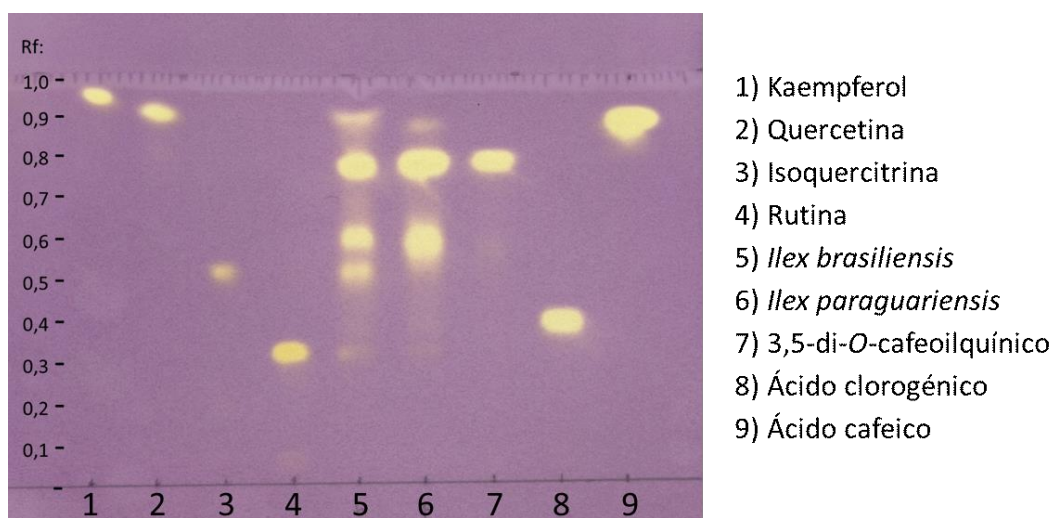


Figura 9. Cromatografía en capa fina: revelado con radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*)

VI.2.3. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución

Los análisis por HPLC-PDA-UV también permitieron comparar el extracto de *I. brasiliensis* respecto a *I. paraguariensis* (Figura 10).

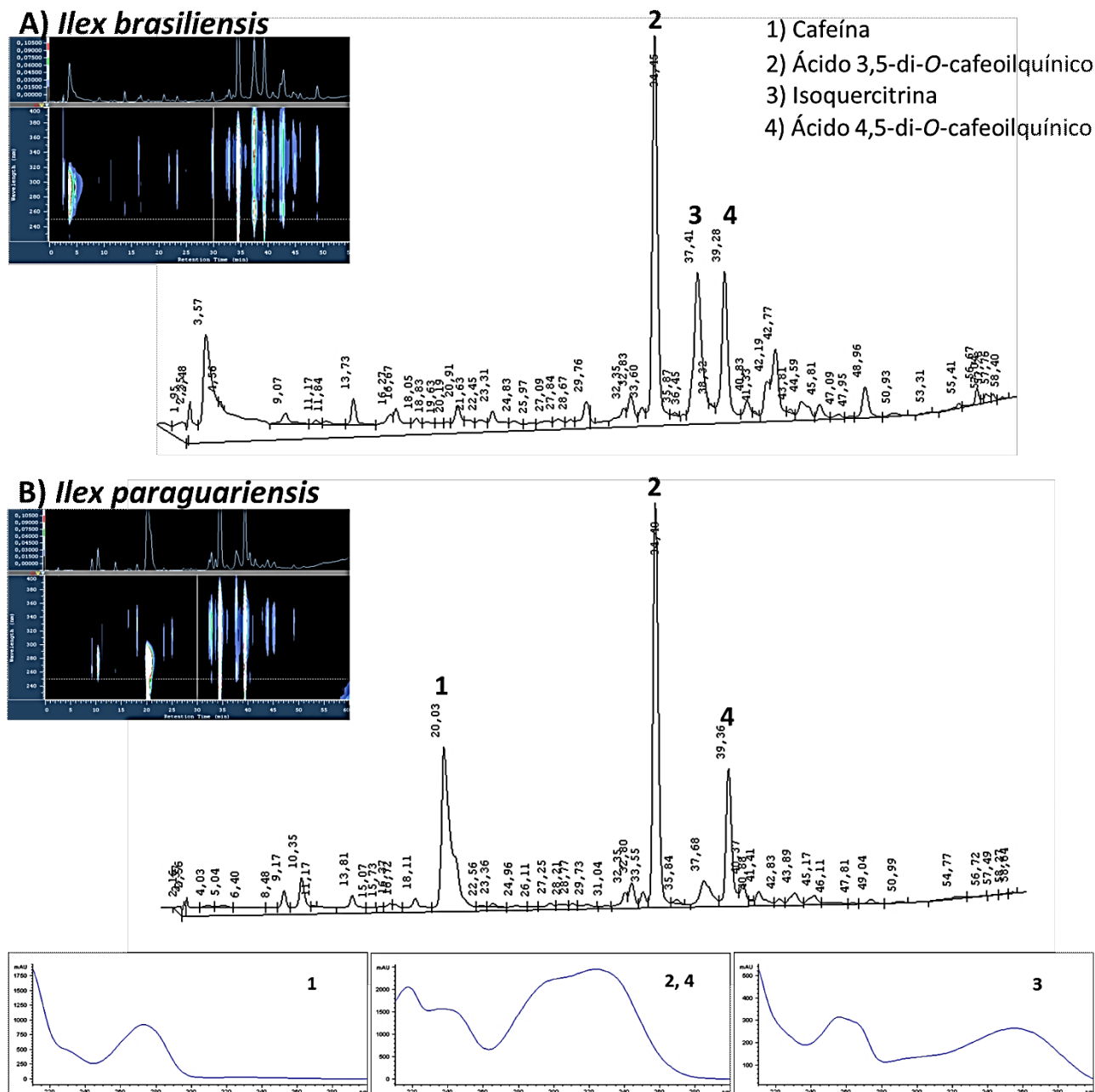


Figura 10. Cromatograma (HPLC-PDA-UV) a 255 nm de *Ilex brasiliensis* e *Ilex paraguariensis* y los espectros de absorción UV de los picos principales.

Los cromatogramas de los extractos mostraron una metilxantina, fenilpropanoides y un flavonoide como los principales compuestos, inicialmente caracterizados por sus espectros UV (Figura 10).

Entre estos compuestos, se observaron dos derivados de ácido dicafeoilquínico que muestran sus características $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción a 327, 295 nm y 246 nm (Zampini *et al.*, 2009; Anesini *et al.*, 2012) y que corresponden a los picos mayoritarios **2** y **4** ($R_t = 34,4$ min y 39,3 min), presentes en ambas especies, identificados por comparación con estándares externos de ácido 3,5 di-*O*-dicafeoilquínico y ácido 4,5 di-*O*-cafeoilquínico, respectivamente (Figura 10, A y B).

El pico mayoritario **3** ($R_t = 37,4$ min) que aparece en *I. brasiliensis* se corresponde con el estándar externo de isoquercitrina (Figura 10, A) mostrando las $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción a 357, 297 nm, 270 nm, y 255 nm (Debenedetti *et al.*, 1983; Tiberti *et al.*, 2007). El pico **1** ($R_t = 20,0$ min) que aparece en *I. paraguariensis* se corresponde con cafeína (Figura 10, B) mostrando una $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción a 272 nm (Belay *et al.*, 2008; Anesini *et al.*, 2012).

Para explorar la presencia de flavonoides glicosilados en *I. brasiliensis* se realizó el análisis por HPLC-ESI-MS en las condiciones previamente descritas en la sección "Materiales y métodos". El cromatograma muestra la presencia de 4 picos cuyos patrones de fragmentación concuerdan con flavonoides glicosilados de quercetina (**1**, **3**, **4**) y kaempferol (**2**) (Figura 11, A).

Sin embargo, el cromatograma de *I. paraguariensis* (Figura 11, B) solo muestra un pico consistente con un glucósido de quercetina (**3**).

Los espectros de fragmentación de **1**, **3** y **4** presentan un pico base común de 300 m/z , correspondiente a la quercetina (Figura 12).

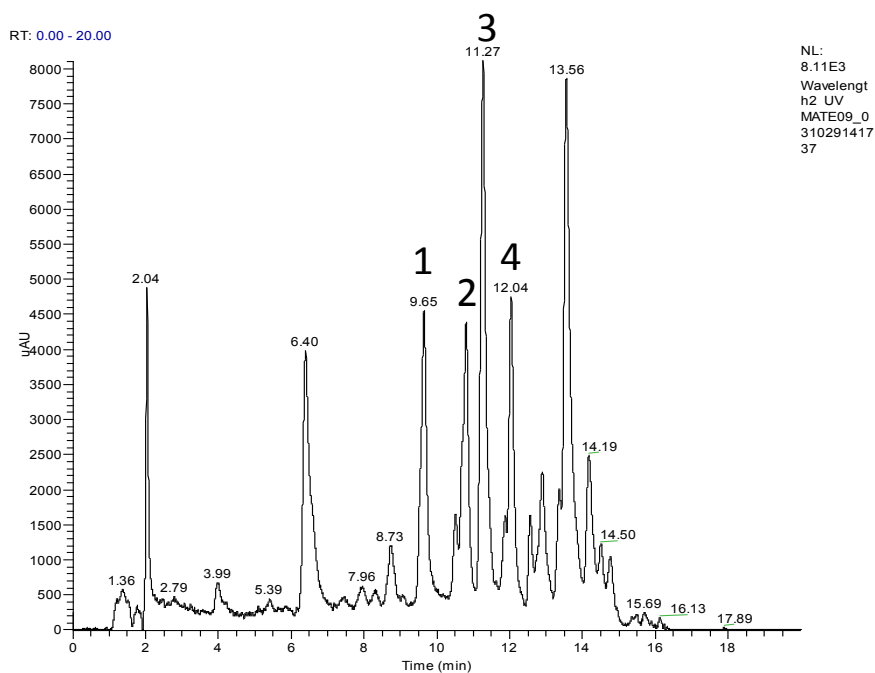
Mediante la ayuda de datos obtenidos de la literatura (Cuyckens & Claeys, 2004; Lu *et al.*, 2010) se discuten los resultados obtenidos con ambos extractos:

El compuesto **1** ($R_t = 9,65$ min) muestra un pico a 625,3 m/z ($M-H^-$) y un pico a 300,3 ($M-2 \times 162-H^-$) lo que corresponde a la pérdida de dos hexosas. Lo que podría corresponder a quercetina diglucósido (Figura 12).

El compuesto **3** ($R_t = 11,27$ min) podría corresponder a la rutina, ya que muestra un ion a 609,3 m/z ($M-H^-$) y un fragmento a 300,3 ($M-162-147-H^-$) lo que indicaría la pérdida de una hexosa y una deoxihexosa, que sería consistente con un residuo rutinosido (glucosa + rhamnosa) (Figura 12). Su presencia en *I. paraguariensis* es también evidente (Figura 13).

El compuesto **4** ($R_t = 12,04$ min) podría corresponder a quercetina monoglucósido ya que muestra un pico a $463,3$ m/z ($M-H^-$) y un pico a $300,3$ ($M-162-H^-$) lo que correspondería a la pérdida de una hexosa (Figura 12).

A) Cromatograma del extracto acuoso de *I. brasiliensis* a 350 nm.



B) Cromatograma del extracto acuoso de *I. paraguariensis* a 350 nm.

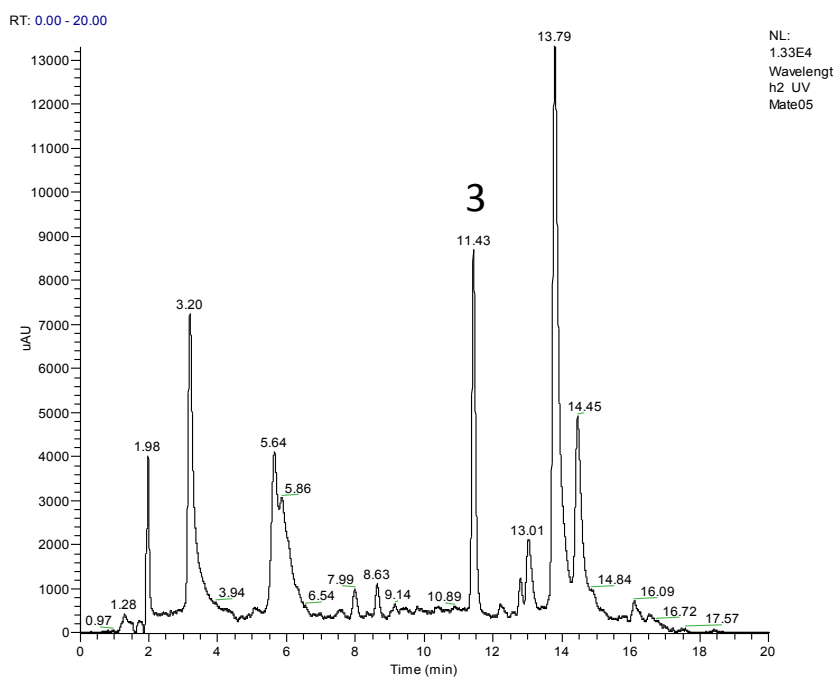
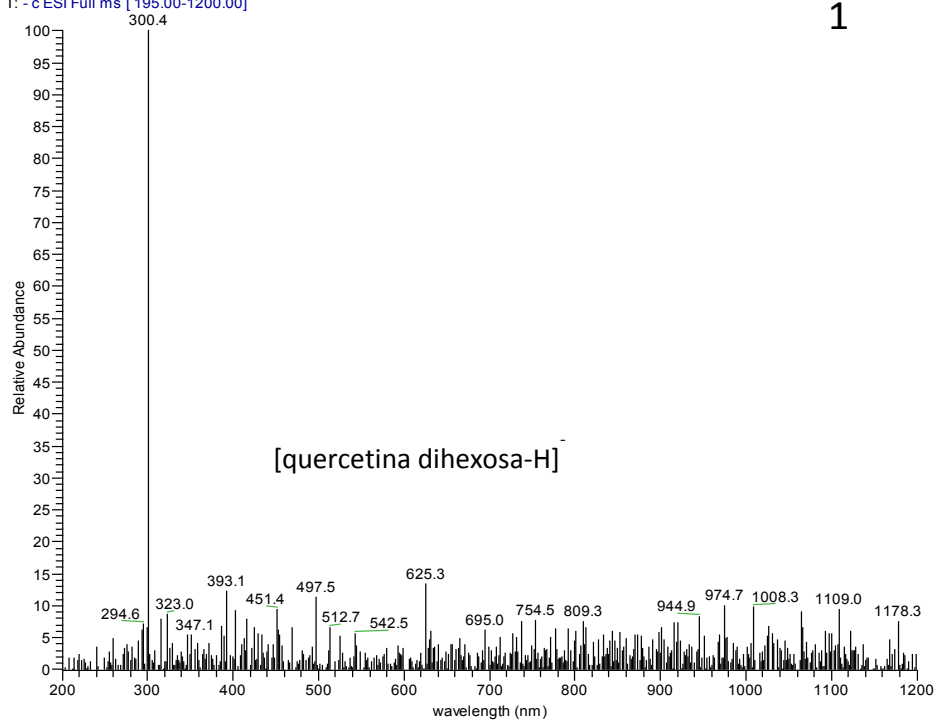


Figura 11. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa

MATE09_031029141737 #568-579 RT: 9.61-9.80 AV: 12 SB: 32 7.13-7.64, 10.22 NL: 8.71E4
T: - c ESI Full ms [195.00-1200.00]



MATE09_031029141737 #659-682 RT: 11.17-11.56 AV: 24 SB: 23 10.15-10.34, 10.89-11.06 NL: 2.01E5
T: - c ESI Full ms [195.00-1200.00]

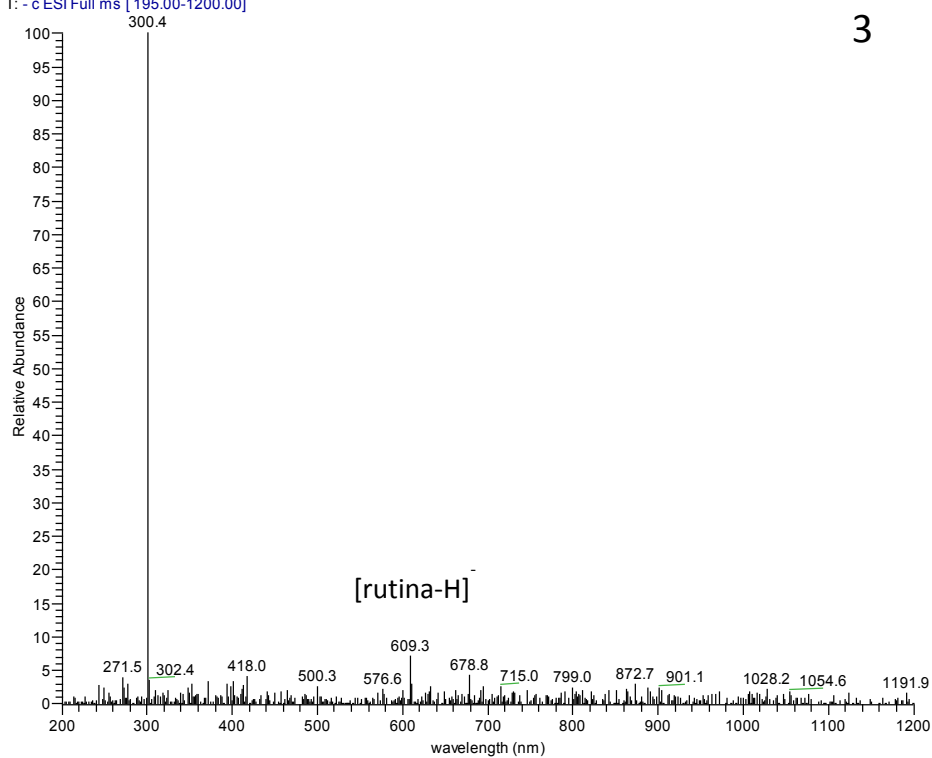


Figura 12. Espectro de fragmentación de los picos 1, 3 y 4 de *I. brasiliensis* (continúa)

MATE09_031029141737 #701-728 RT: 11.88-12.35 AV: 28 SB: 23 10.15-10.34, 10.89-11.06 NL: 1.12E5
T: - c ESI Full ms [195.00-1200.00]

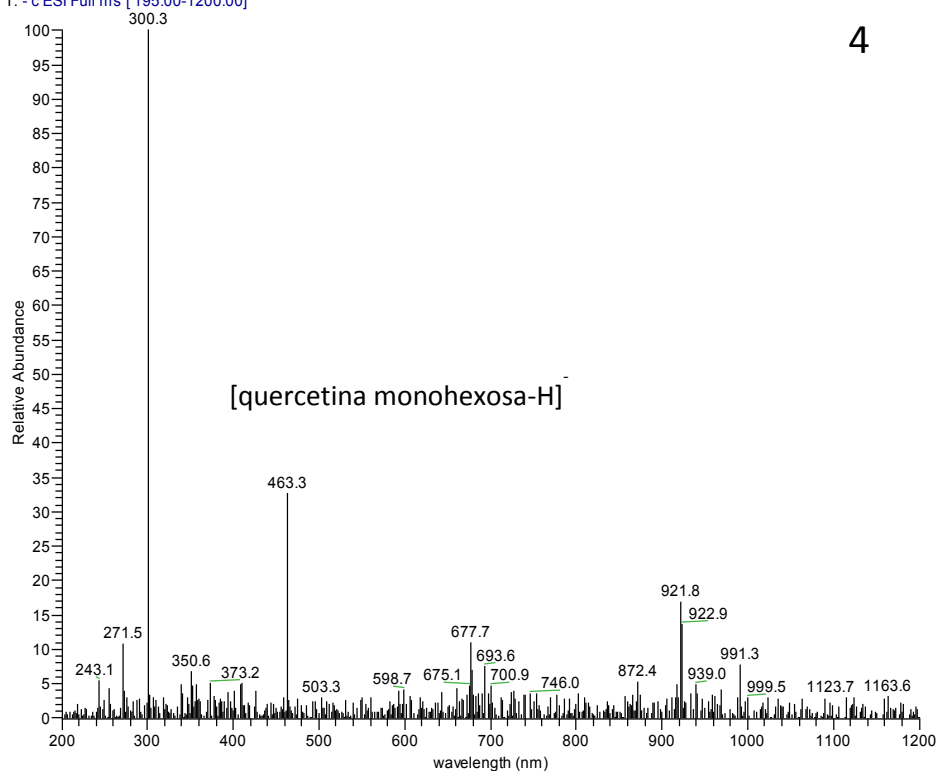


Figura 12. Espectro de fragmentación de los picos 1, 3 y 4 de *I. brasiliensis*

Mate05 #702-721 RT: 11.25-11.56 AV: 20 SB: 26 10.72-11.11, 11.93 NL: 1.08E5
T: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

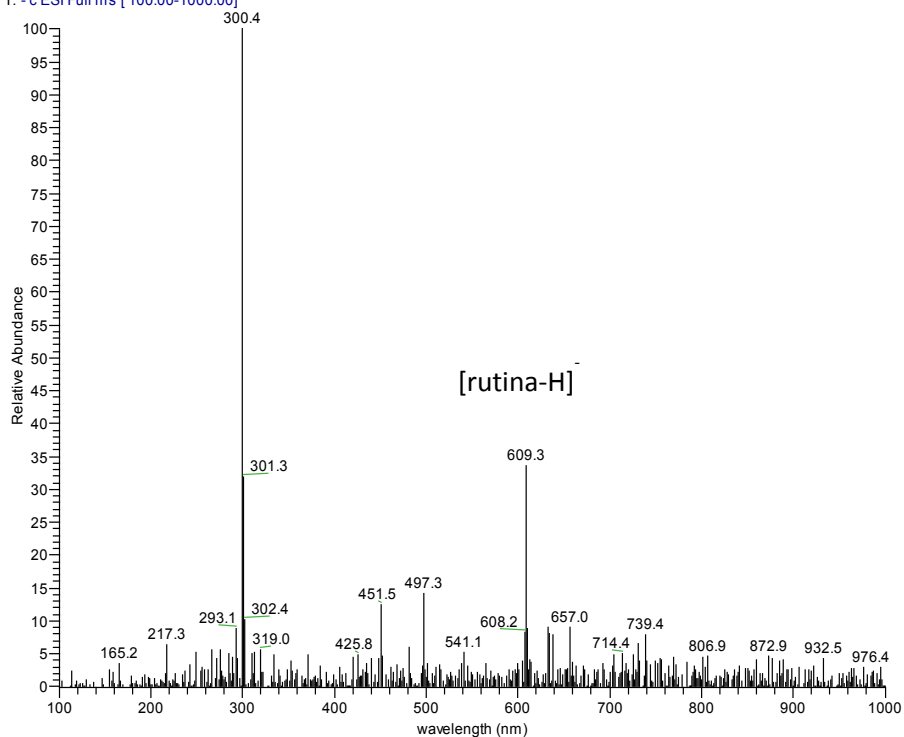


Figura 13. Espectro de fragmentación del pico 3 de *I. paraguariensis*

El espectro del pico **2** (Rt= 10,70-11,05 min) es complejo y puede que contenga más de un compuesto (Figura 14). Sin embargo la preponderancia del fragmento de 284,3 m/z es diagnóstico de kaempferol 3-*O*-glicósidos (Lu *et al.*, 2010). La señal a 695,6 m/z podría indicar que este glicósido sería un malonildiglicósido (hexosas) (286 + (2 x 162) + 86-H⁻). Otros flavonoides similares han sido descritos previamente en *I. paraguariensis*, por ejemplo kaempferol 3-*O*-(2''-*O*-alfa-ramnosil-6''-*O*-malonil)-beta-glucósido (Sugimoto *et al.*, 2009). Las señales a 497 y 451 m/z podrían pertenecer a otros compuestos co-eluyendo con el glicósido de kaempferol. En este análisis no se pudo relacionar ninguno de ellos con otros metabolitos característicos de *Ilex* (Bravo *et al.*, 2007).

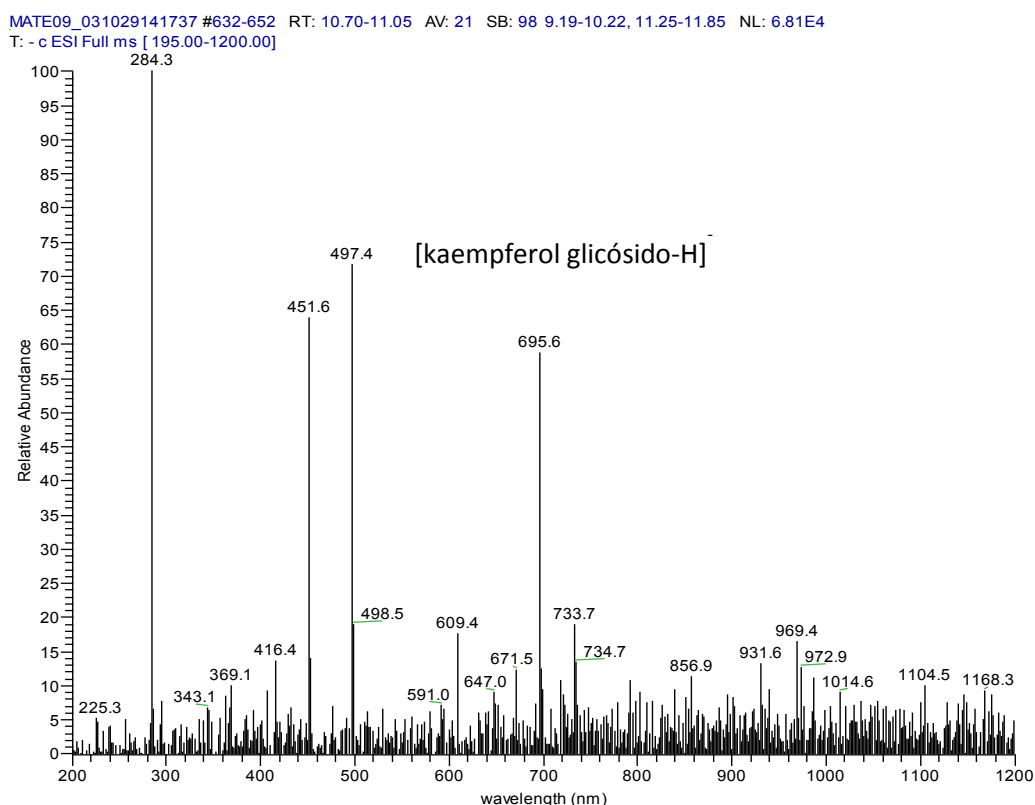


Figura 14. Espectro de fragmentación del pico **2** (Rt= 10,70-11,05 min) en *I. brasiliensis*

VI.3. Actividad antioxidante de *Ilex brasiliensis*

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de un extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis*. Para tal fin se utilizaron distintos modelos experimentales *in vitro* que permitieron evaluar su capacidad antioxidante como atrapadores de especies oxidantes radicalarias y no radicalarias y como inhibidores de la peroxidación lipídica.

VI.3.1. Determinación de la actividad antioxidante total y atrapadora de ERO

Se midió la actividad antioxidante total de *I. brasiliensis* mediante la evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres estables, ABTS^{•+} y DPPH[•]. El extracto de *I. brasiliensis* demostró poseer una potente actividad atrapadora de estos radicales libres (Tabla 5).

En comparación con *I. paraguariensis*, no se observaron diferencias significativas en presencia del radical metaestable DPPH. Sin embargo, en los ensayos en presencia del radical ABTS^{•+}, el extracto de *I. brasiliensis* demostró una mayor capacidad reductora del radical libre (P<0,01).

Tabla 5. CI₅₀^a del extracto acuoso de *Ilex brasiliensis* en sistemas atrapadores de radicales libres y peroxinitrito

	ABTS ^{•+}	DPPH [•]	O ₂ ^{•-}	ONO ₂ ⁻
<i>Ilex brasiliensis</i>	12,2 (10,2-14,2)	8,6 (4,9-12,3)	16,2 (14,5-17,8)	28,5 (19,3-37,7)
<i>Ilex paraguariensis</i>	17,2 ** (16,3-18,0)	7,7 (5,5-9,9)	15,4 (8,9-21,9)	170,7 ** (146,6-194,1)

^a µg/mL. Los valores entre paréntesis corresponde al intervalo de confianza 95%, n=5. **P<0,01 respecto a *Ilex brasiliensis*.

El poder reductor de Fe⁺³ se evaluó mediante el ensayo FRAP; ambos extractos demostraron poseer capacidad reductora. Nuevamente, *I. brasiliensis* mostró una actividad antioxidante total significativamente mayor respecto a *I. paraguariensis* (211 vs. 140 µmol EQ ácido ascórbico/mg extracto).

La capacidad atrapadora de las ERO del extracto de *I. brasiliensis* se realizó mediante el uso de diferentes sistemas *in vitro*. La actividad captadora de radical superóxido fue determinada utilizando el sistema hipoxantina /XOD /NBT. Ambos extractos mostraron una alta actividad captadora del radical y no se observaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 5). Previamente a este estudio, como parte de los controles del método, se evaluaron los extractos como reductores de NBT e inhibidores de XOD y no mostraron ninguna de estas actividades en ambos ensayos (datos no mostrados).

Los extractos también se ensayaron frente al radical hidroxilo, generado por el sistema Fe⁺³ - EDTA / H₂O₂ en presencia y ausencia de ascorbato. En este ensayo *I. brasiliensis* no

mostró actividad captadora de radical hidroxilo. Sin embargo, se observó muy alta actividad pro-oxidante en presencia y en ausencia de ascorbato (Figura 15, A y B).

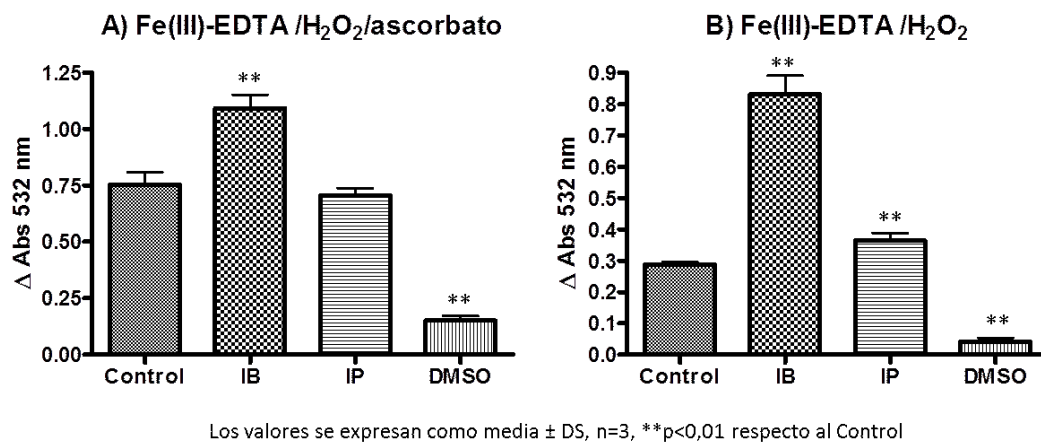
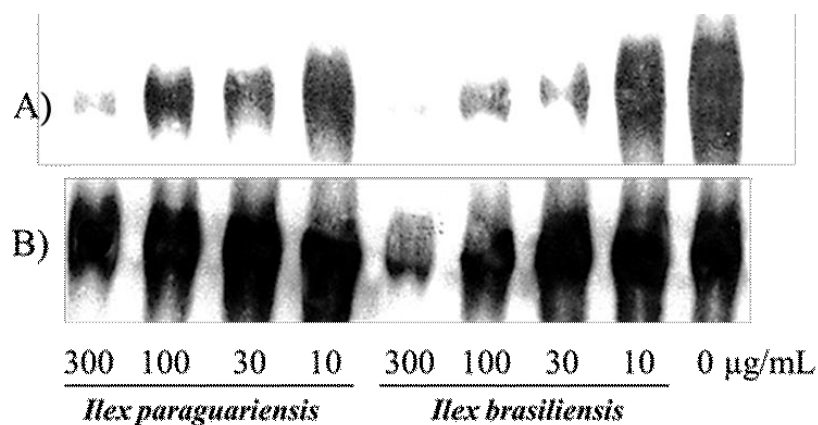


Figura 15. Efecto de *Ilex brasiliensis* sobre la degradación de desoxirribosa inducida por Fe⁺³ - EDTA / H₂O₂

Ambos extractos mostraron una actividad atrapadora de peroxinitrito utilizando el ensayo de decoloración del rojo de pirogalol (Tabla 5). El extracto de *I. brasiliensis* demostró una mayor capacidad antioxidante que el extracto de *I. paraguariensis* (P<0,01).

La nitración de la ASB con peroxinitrito en ausencia y presencia de bicarbonato fue evaluada mediante la técnica de Western blot (Figura 16). *I. brasiliensis* inhibió la nitración de manera concentración dependiente y demostró una mayor capacidad inhibitoria que *I. paraguariensis*.



A) Ausencia de bicarbonato; B) presencia de bicarbonato

Figura 16. Inhibición de la nitración de albúmina sérica bovina por *Ilex brasiliensis*

VI.3.2. Inhibición de la peroxidación lipídica

La incubación de microsomas hepáticos de rata con Fe^{2+} /ascorbato o CCl_4 /NADPH a pH 7,4 causa una rápida peroxidación lipídica detectable por el método del TBA. La Tabla 6, muestra las actividades antioxidantes de los extractos inhibiendo la peroxidación enzimática y no enzimática.

Tabla 6. CI_{50}^a de *Ilex brasiliensis* para la inhibición de la peroxidación lipídica de microsomas hepáticos de rata

	Sistema peroxidante	
	Fe^{2+} / ascorbato	CCl_4 / NADPH
<i>I. brasiliensis</i>	35,9 (33,6-38,1)	13,5 (8,7-18,4)
<i>I. paraguariensis</i>	31,7 ** (26,4-34,6)	12,7 (6,7-18,7)

^a $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los valores entre paréntesis corresponde al intervalo de confianza 95%, n=5. ** $P < 0,01$ respecto a *Ilex brasiliensis*.

En los ensayos realizados en el sistema Fe^{2+} /ascorbato, ambos extractos mostraron actividad antioxidante. El cálculo de la CI_{50} demostró que la capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica de *I. brasiliensis* es leve, pero significativamente menor que la correspondiente a *I. paraguariensis* ($P < 0,01$).

Ambos extractos inhibieron la peroxidación lipídica inducida por el sistema CCl_4 /NADPH y no demostraron ninguna diferencia estadística respecto a su actividad. Con la finalidad de verificar si la actividad antioxidante observada en este último ensayo se debería, al menos en parte, a un efecto sobre el sistema enzimático responsable de la transformación del CCl_4 , se midió la actividad de CYP2E1 y no se observaron efectos inhibitorios de los extractos (dato no mostrado).

La capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica inducida por Cu^{2+} también se ensayó sobre LDL plasmáticas humana. La extensión de la oxidación se midió a través de la formación de dienos conjugados, la formación de SRTBA y los cambios en la movilidad electroforética en gel de agarosa.

La Figura 17 muestra el efecto antioxidante concentración dependiente de los extractos de *Ilex* para la iniciación (fase lag) y propagación de la peroxidación lipídica de las LDL. En las

condiciones de ensayo descritas por encima de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ambos extractos previnieron en forma total la formación de dienos conjugados.

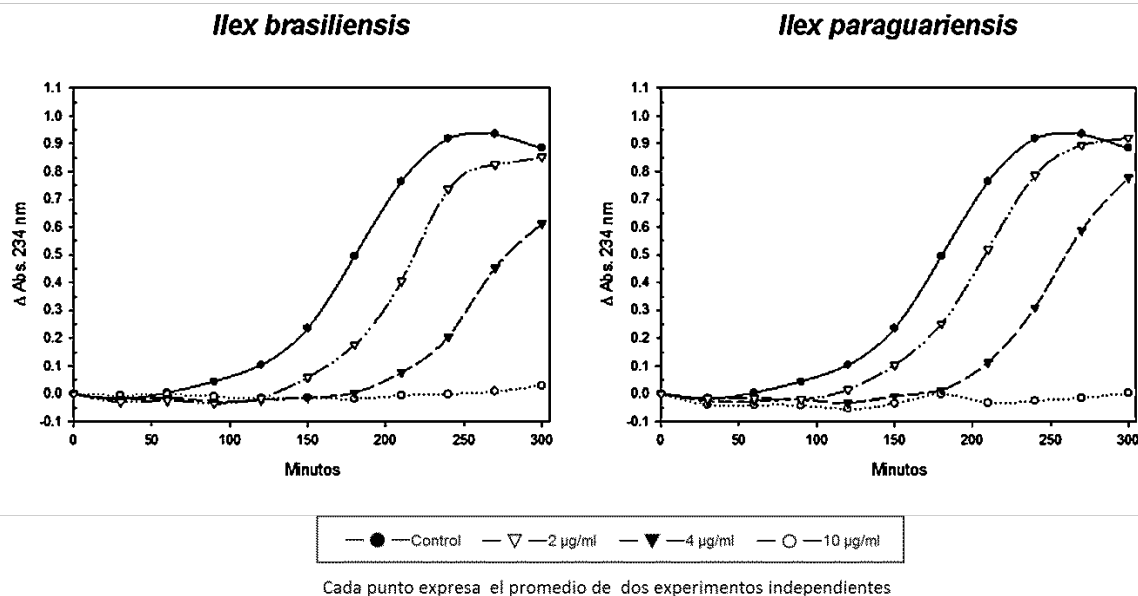
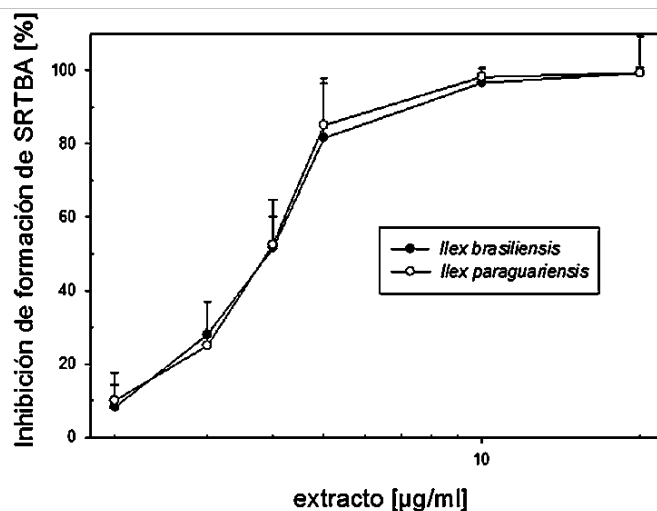


Figura 17. Peroxidación lipídica de LDL inducida por Cu (II): Inhibición de la formación de dienos conjugados

La capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica de LDL inducida por Cu^{2+} también se determinó midiendo la formación de SRTBA. Estos resultados confirmaron la capacidad antioxidante de *I. brasiliensis* (Figura 18), no observándose diferencias estadísticas con *I. paraguariensis*.



Los valores de cada punto se expresan como media \pm DS, n=3

Figura 18. Peroxidación lipídica de LDL inducida por Cu (II): Inhibición de la formación de SRTBA

Después del tratamiento con 10 μM de Cu^{2+} la movilidad electroforética de las LDL oxidadas esta aumentada respecto a la LDL nativa. Ambos extractos produjeron la modulación de la movilidad de una manera concentración dependiente (Figura 19) y por encima de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ previnieron en forma total la modificación de la movilidad.

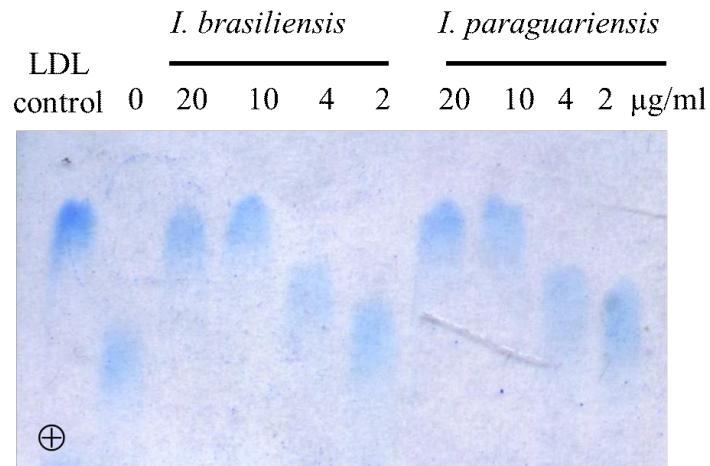


Figura 19. Peroxidación lipídica de LDL inducida por Cu (II): Inhibición de la movilidad electroforética

La susceptibilidad a la oxidación de suero humano también se evaluó utilizando 1 mM Cu^{2+} como inductor del proceso oxidativo. La extensión de la oxidación se midió a través de la formación de SRTBA. La presencia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ambos extractos inhibió la formación de SRTBA (Figura 20) y no se detectaron diferencias estadísticas entre ellos.

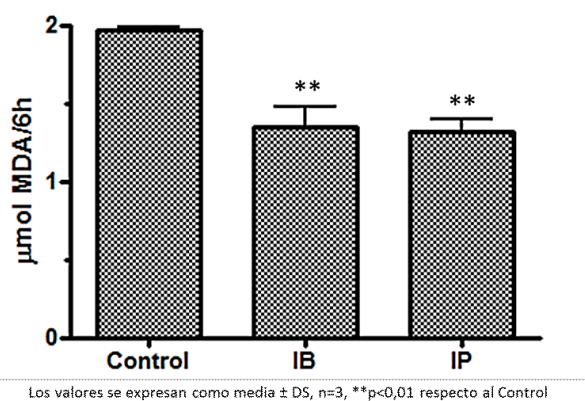


Figura 20. Peroxidación lipídica de suero humano inducida por Cu (II): Inhibición de la formación de SRTBA

VI.3.3. Actividad quelante

Ambos extractos no demostraron actividad quelante del ion Fe^{+2} (dato no mostrado).

VI.4. Efectos de un extracto acuoso de *I. brasiliensis* en la fisiopatología del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión

VI.4.1. Función (sistólica y diastólica) miocárdica

La Figura 21 (panel superior) muestra los efectos de los extractos acuosos de *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis* sobre la función sistólica en nuestra preparación de 20 min de isquemia global seguida por 30 min de reperfusión. Se determinó una disminución en la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP), respecto de la línea de base pre-isquémica, en los corazones no tratados (C: control isquémico). El tratamiento con los extractos acuosos liofilizados (30 µg/mL) de *I. brasiliensis* (B) e *I. paraguariensis* (P) mejoró la recuperación post-isquémica, alcanzando al final del experimento valores de LVDP de 110 ± 3 % y 96 ± 8 %, respectivamente, en contraste con 57 ± 6 % en los corazones C ($P < 0,05$ contra cada grupo tratado).

Cuando se analizaron los valores $+dP/dt_{\max}$ se observó un patrón similar a lo descrito anteriormente. La Figura 21 (panel inferior) muestra que *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis* mejoraron significativamente este parámetro de la contractilidad, llegando al final del período de reperfusión con valores más altos que los observados en los corazones no tratados (110 ± 3 % y 95 ± 10 % vs. 53 ± 6 %, $P < 0,05$). Aunque no hubo diferencias estadísticas entre ambos tratamientos, la mejoría de la función sistólica post-isquémica de *I. brasiliensis* fue ligeramente mayor que *I. paraguariensis*.

Al examinar la máxima velocidad de descenso de la PVI ($-dP/dt_{\max}$) se observó una mejora de la velocidad de relajación por los tratamientos con *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis* (118 ± 5 % y 90 ± 12 % vs. 57 ± 8 % en los corazones no tratados, $P < 0,05$) (Figura 22, panel superior).

El aumento de la rigidez diastólica detectada durante la reperfusión en corazones no tratados fue significativamente atenuada por los tratamientos con *I. brasiliensis* e *I. paraguariensis*. Al final de la reperfusión, los valores de la LVEDP en los corazones tratados resultaron menores que los obtenidos en los corazones no tratados (10 ± 1 mmHg para *I. brasiliensis* y 20 ± 6 mmHg para *I. paraguariensis* vs. 43 ± 4 mmHg en los corazones del grupo C, $P < 0,05$) (Figura 22, panel inferior).

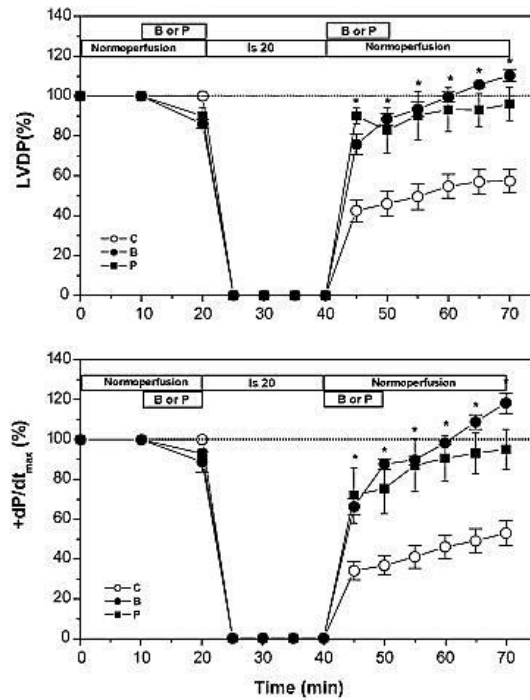


Figura 21. Evolución temporal de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP, panel superior) y la máxima velocidad de ascenso de la presión ventricular izquierda (+dP/dt_{max}, panel inferior) durante isquemia y reperfusión de corazones tratados con *I. brasiliensis* (B) e *I. paraguariensis* (P). *P<0,05 respecto a C.

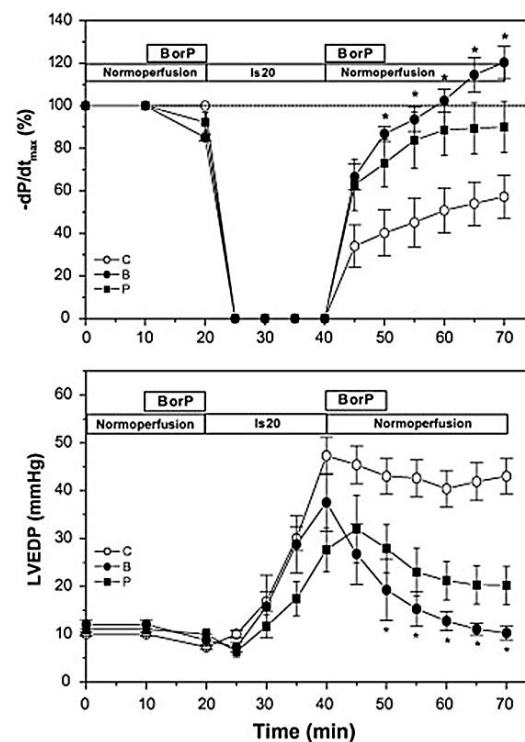


Figura 22. Evolución temporal la máxima velocidad de descenso de la presión ventricular izquierda (-dP/dt_{max}, panel superior) y la presión distólica final en el ventrículo izquierdo (LVEDP, panel inferior) durante isquemia y reperfusión de corazones tratados con con *I. brasiliensis* (B) e *I. paraguariensis* (P). *P<0,05 respecto a C.

La inhibición de la NOS con L-NAME abolió el efecto protector de *I. brasiliensis* en la recuperación post-isquémica de la función miocárdica sistólica obteniéndose al final del experimento valores de $58 \pm 9\%$ y $64 \pm 8\%$ para LVDP y $+dP/dt_{max}$, respectivamente (Figura 23). Además, la atenuación de la rigidez diastólica obtenida con *I. brasiliensis* también fue abolida cuando se inhibió la NOS con L-NAME (B + L-NAME), alcanzando la LVEDP un valor de 39 ± 5 mmHg al final del período de reperfusión.

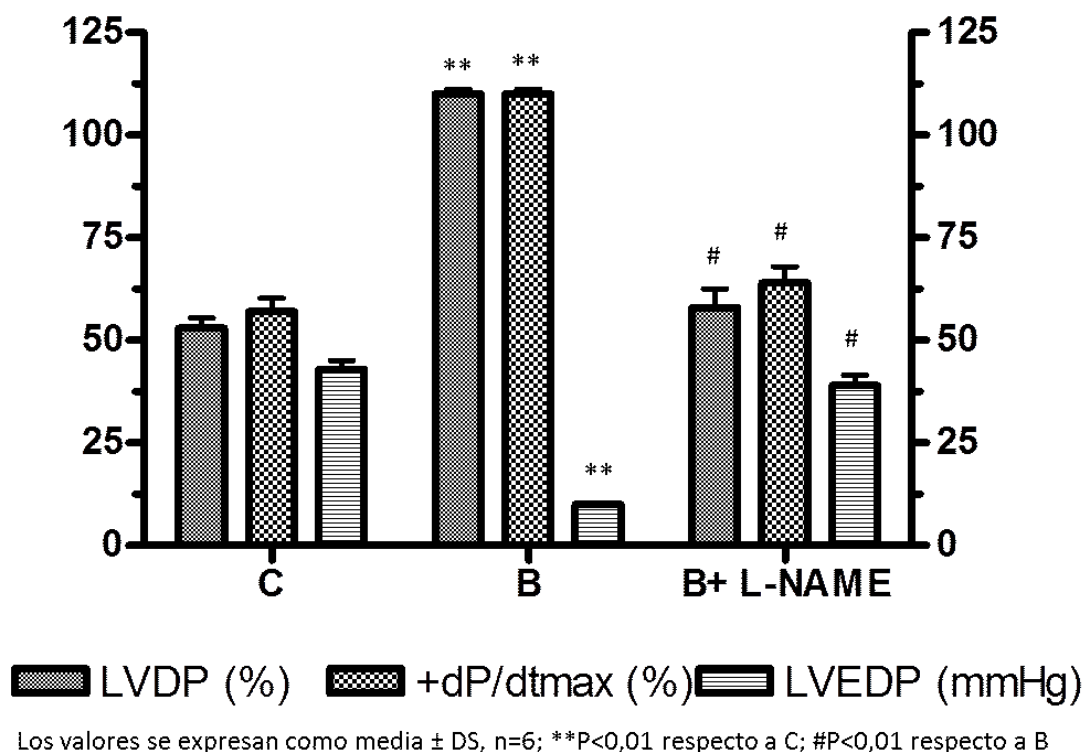
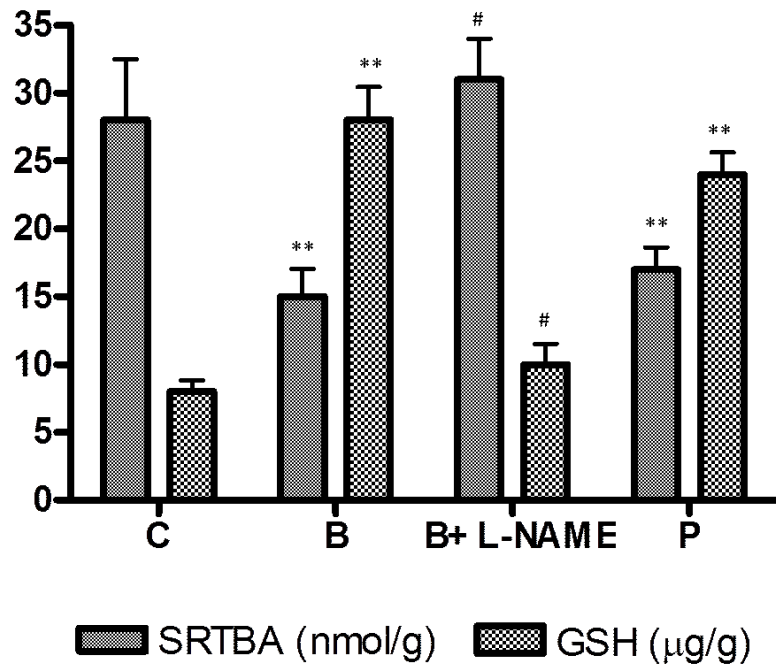


Figura 23. Valores de LVDP, $+dP/dt_{max}$ y LVEDP al finalizar el período de reperfusión en corazones control isquémicos (C), tratados con *I. brasiliensis* (B) y tratados con *I. brasiliensis* en presencia de L-NAME (B + L-NAME)

VI.4.2. Daño oxidativo del tejido cardíaco

La evaluación del estado oxidativo del tejido cardíaco sometido a isquemia y reperfusión se realizó midiendo los contenidos de SRTBA y GSH.

El contenido de SRTBA disminuyó y el nivel de GSH se conservó parcialmente cuando los corazones fueron tratados con *I. brasiliensis* en comparación con los corazones no tratados. Estos efectos beneficiosos fueron anulados en presencia del inhibidor de la NOS detectándose un aumento de la peroxidación lipídica y un menor nivel de GSH (Figura 24). La protección del daño oxidativo del tejido cardíaco de ambos extractos fue similar.



Los valores se expresan como media \pm DS, n=6; **p<0,01 respecto a C; #p<0,01 respecto a B

Figura 24. Evaluación del daño oxidativo inducido por isquemia y resperfusión en corazones control isquémicos (C), tratados con *I. brasiliensis* (B) e *I. paraguariensis* (P).

VII. Discusión

VII.1. Caracteres morfoanatómicos y fitoquímicos

En esta tesis se aplicaron los métodos de análisis micrográfico y fitoquímico para la caracterización farmacognóstica del órgano foliar de *I. brasiliensis*. Una particularidad de su objeto de estudio es que constituye la materia prima de uso popular como sustituto o adulterante de la yerba mate (Graham, 1984; Giberti, 1989).

La importancia del análisis micrográfico en el estudio de especies de *Ilex* relacionadas con la yerba mate fue reconocida por Augusto Scala en su trabajo titulado “*Contribución al conocimiento histológico de la yerba mate y sus falsificaciones*” (Scala, 1921).

En esta investigación, el análisis micrográfico posibilitó la caracterización de *I. brasiliensis* en comparación con *I. paraguariensis*. Específicamente, se pudieron distinguir cualitativamente los caracteres morfoanatómicos diferenciales entre ambas especies (Tabla 3). Entre los que se destacan el tipo de estomas presentes en la epidermis abaxial, la estructura del haz vascular y la vaina de esclerénquima de la vena media foliar. Como se ha visto, el análisis micrográfico se complementó con dos métodos cuantitativos: el “Índice de Estomas” y el “Índice de Empalizada”. Los resultados obtenidos mediante estos métodos permitieron establecer el “status taxonómico” diferencial de las dos especies en estudio.

En cuanto al análisis fitoquímico, es frecuente encontrar la presencia común de componentes entre plantas de la misma familia y el mismo género, dado que ellas poseen mecanismos similares de defensa activados por los mismos metabolitos secundarios.

Al respecto, trabajos fitoquímicos realizados con 11 especies de *Ilex* sudamericanas procuraron identificar biomarcadores para definir, mediante espectroscopia de RMN, una clasificación quimiotaxonómica (Choi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). A partir de los resultados obtenidos se formaron cuatro grupos según su composición química: las especies incluidas en el grupo A (*I. paraguariensis*) fueron metabólicamente caracterizadas por una mayor cantidad de xantinas y compuestos fenólicos, incluyendo fenilpropanoides y flavonoides; grupo B, con saponinas tipo oleanano (*I. dumosa* var. *dumosa* e *I. dumosa* var. *guaranina*); grupo C, con arbutina y ácidos dicafeoilquínicos (*I. brasiliensis*, *I. integerrima*, *I. pseudobuxus* e *I. theezans*) y grupo D, con el más alto nivel de saponinas de tipo ursano (*I. argentina*, *I. brevicuspis*, *I. microdonta* y *I. taubertiana*) (Kim *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se caracterizó fitoquímicamente el extracto acuoso de *I. brasiliensis* en forma comparativa con *I. paraguariensis* utilizando diferentes técnicas cromatográficas.

En primer lugar, en el análisis de ambos extractos por CCF y HPLC-PDA-UV se observó la presencia de dos compuestos que se corresponden con las referencias de ácido 3,5 di-*O*-dicafeoilquínico y ácido 4,5 di-*O*-cafeoilquínico.

También, de los datos obtenidos en el análisis por HPLC-PDA-UV de *I. brasiliensis* se verificó la ausencia de cafeína en su composición química (Figura 10 A), esta observación fue coincidente con los resultados previos publicados por Filip *et al.* (2008).

La cafeína es la metilxantina más abundante en *I. paraguariensis* (yerba mate) y es la responsable de la actividad psicoestimulante de sus infusiones (Andújar *et al.* 2014). Los datos obtenidos en este estudio permiten concluir que la ausencia de cafeína en el extracto de *I. brasiliensis* es una característica fitoquímica diferencial respecto de *I. paraguariensis*.

En segundo lugar, para explorar la presencia de otros flavonoides glicosilados en *I. brasiliensis*, se realizó el análisis por HPLC-ESI-MS. Este análisis demostró que esta especie posee un metabolismo que permite la síntesis de una mayor variedad de flavonoides derivados de quercetina y kaempferol que *I. paraguariensis* (Figura 11).

Los estudios fitoquímicos realizados por HPLC-ESI-MS permitieron identificar un glucósido de quercetina como uno de los principales compuestos fenólicos diferenciales respecto de *I. paraguariensis*, identificado con un pico 463,3 *m/z* (M-H⁻) (Figura 12, pico 4). Esta observación fue coincidente con los estudios realizados por CCF (Figura 9) y HPLC-PDA-UV (Figura 10 A) en los cuales se pudieron observar la presencia de un compuesto que se corresponde a isoquercitrina. La presencia de este flavonoide parecería ser una característica diferencial con *I. paraguariensis*, sin embargo, se necesitaría el análisis de un número mayor de muestras para corroborar tal afirmación.

Los datos hasta aquí descritos son relevantes puesto que determinan características diferenciales de cada especie y permiten el establecimiento de su autenticidad, adulteraciones o sustituciones.

VII.2. Actividad antioxidante y cardioprotectora

Cuzzocrea *et al.* (2001) propusieron la terapia anti-oxidante como un nuevo enfoque farmacológico para el tratamiento del shock, la inflamación y la lesión por isquemia/reperfusión, conocida como "hipótesis antioxidante".

Esta hipótesis afirma que los compuestos, extractos de plantas medicinales y suplementos alimentarios con propiedades antioxidantes pueden prevenir los problemas de salud relacionados con el estrés oxidativo.

Debido al consumo masivo y la importancia comercial en nuestra región, *Ilex paraguariensis* (yerba mate) ha concentrado la atención de muchos grupos de investigación que realizaron estudios sobre su composición química y demostraron una gran variedad de propiedades biológicas (Heck & de Mejía, 2007; Bracesco *et al.*, 2011, Andújar *et al.*, 2014).

Las propiedades antioxidantes de la yerba mate han sido ampliamente estudiadas por Gugliucci *et al.* (1996), Schinella *et al.* (2000), Filip *et al.* (2000), Bracesco *et al.* (2003), Rivelli *et al.* (2007) y Vieira *et al.* (2010). Varios estudios han concluido que la actividad antioxidante de la yerba mate es comparable con la de otras sustancias antioxidantes naturales, que son conocidas como té verde y negro, vino tinto y jugo de naranja, entre otras (Chandra & González de Mejía, 2004; Bixby *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2007; Dudonné *et al.*, 2009; Barg *et al.*, 2014).

En este estudio, se demostró que *I. brasiliensis* posee una elevada actividad antioxidante *in vitro* como atrapador de radicales libres estables (DPPH y ABTS) y de especies reactivas derivadas de oxígeno (superóxido y peroxinitrito) (Tabla 5). También, se demostró su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica enzimática y no enzimática de microsomas hepáticos de rata (Tabla 6) y proteger a las LDL de la peroxidación lipídica inducida por cobre (Figura 17, 18 y 19).

El extracto acuoso de *I. brasiliensis* demostró similar capacidad antioxidante que *I. paraguariensis* en la mayoría de los análisis; y una mayor actividad como atrapador del radical ABTS (Tabla 5) y peroxinitrito (Tabla 5 y Figura 16) y reductor de Fe^{+3} , evaluado mediante el ensayo FRAP (211 vs. 140 μmol EQ ácido ascórbico/mg extracto) y el sistema Fe^{3+} -EDTA- H_2O_2 (Figura 15).

En función de lo antes expresado, resulta oportuno considerar dos aspectos salientes que explicarían las diferencias observadas. Por una parte, la mayor concentración de ácido

ascórbico en el extracto de *I. brasiliensis* en comparación a la concentración determinada en *I. paraguariensis*; por otra, la propiedad del ácido ascórbico para atrapar radical ABTS y peroxinitrito y reducir el Fe^{+3} (Arnao, 1999; Squadrito *et al.*, 1995; Burkitt & Gilbert, 1990). Estos dos aspectos justificarían la mayor actividad antioxidante de *I. brasiliensis* en los sistemas antes mencionados.

Como es conocido, los episodios de isquemia y reperfusión miocárdica se asocian con la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno, tales como el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, que producen alteraciones estructurales y funcionales que llevan a la lesión celular reversible o irreversible (Bolli, 1998).

Las condiciones presentes en la isquemia y la reperfusión también estimulan un aumento de la síntesis de óxido nítrico (NO) que puede prevenir o promover la muerte celular (Bolli, 2001; Heusch *et al.*, 2008). El NO se combina rápidamente con $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar peroxinitrito (ONOO^-), éste último reacciona con una amplia variedad de moléculas que incluyen la desoxirribosa, los lípidos y los grupos tioles de las proteínas produciendo daño oxidativo (Kim *et al.*, 2004).

Diversos trabajos muestran que durante la isquemia-reperfusión el NO producido como consecuencia de la activación de eNOS a través de vías que involucran cinasas cardioprotectoras (RISK) atenúa la apertura del PPTM (Davinson *et al.*, 2006; Hausenloy & Yellon, 2007; Heusch *et al.*, 2008) (Figura 6).

En este estudio, la atenuación de la disfunción sistólica y diastólica conferida por el tratamiento con *I. brasiliensis* (Figura 21 y 22) fue abolida cuando se inhibieron las diferentes isoformas de NOS con L-NAME (Figura 23), lo que indicaría que el NO está involucrado en los eventos que conducen a la protección.

La activación de las cinasas cardioprotectoras involucra al menos dos caminos importantes que pasan por la activación de la proteína cinasa B (PKB/Akt) y la cinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2) que conducen a: 1) la fosforilación y la inhibición de GSK-3 β , 2) la fosforilación de la eNOS, que estimula la producción de NO, el cual inhibe la apertura de PPTM y 3) la fosforilación directa o indirecta de Bad a través de p70S6K, que impide su efecto proapoptótico (Davinson *et al.*, 2006; Hausenloy & Yellon, 2007; Heusch *et al.*, 2008) (Figura 6).

En un trabajo reciente utilizando un modelo de isquemia regional se demostró que el tratamiento con un extracto acuoso de *I. paraguariensis* disminuyó el tamaño del infarto y el daño oxidativo a través de la vía Akt/eNOS/GSK-3 β (González Arbeláez *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta que la vía PI3K/Akt es la que puede activar la eNOS, los datos presentados aquí sugieren que uno o varios de los componentes del extracto acuoso de *I. brasiliensis* podrían activar la vía PI3K/Akt/eNOS, a partir de su interacción con un receptor acoplado a proteína G y/o por la activación de la expresión génica de dichas enzimas. Estas acciones llevarían a un aumento de la síntesis de NO lo que permitiría explicar las acciones cardioprotectoras del extracto (Figura 25).

Por otro lado, la sobreproducción de las ERO durante la reperfusión oxida el cofactor esencial de la eNOS (tetrahidrobiopterina, BH4) lo que convierte a la eNOS en una enzima productora de $O_2^{\bullet-}$ (Dumitrescu *et al.*, 2007) favoreciendo el daño oxidativo; situación conocida comúnmente como desacoplamiento de la eNOS. Por lo tanto, la alta actividad de captación de $O_2^{\bullet-}$ y ONOO⁻ de *I. brasiliensis* (Tabla 6) podría contribuir a la estabilización de la BH4 y al aumento de la biodisponibilidad de NO, pudiendo facilitar la normalización de la función endotelial y la mejora de la función miocárdica post-isquémica (Figura 25), como se sugirió anteriormente para *I. paraguariensis* (Schinella *et al.*, 2005).

El ascorbato, la forma desprotonada del ácido ascórbico (vitamina C), actúa como un agente reductor soluble en agua y antioxidante en los sistemas biológicos; es un micronutriente esencial para los seres humanos. Los bajos niveles de ascorbato en plasma se observan en varias enfermedades relacionadas con el aumento de estrés oxidativo, tales como cáncer, diabetes mellitus, cataratas, infección por VIH y sepsis, o en fumadores (Ladurner *et al.*, 2012).

En células endoteliales cultivadas se demostró que el ascorbato estabiliza el cofactor BH4 de la eNOS (Heller *et al.*, 2001), evitando el desacoplamiento. Recientemente, Ladurner *et al.* demostraron un nuevo mecanismo de cómo el ascorbato activa rápidamente la eNOS independiente de sus efectos sobre la estabilización de la BH4. La activación enzimática de la eNOS se consigue mediante la modulación de actividades de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la cinasa activada por AMP (AMPK), que resulta en cambios específicos en la fosforilación de la eNOS en Ser1177 y Thr495 (Ladurner *et al.*, 2012). La AMPK se activa cuando el suministro de oxígeno está restringido, actuando como un sensor de estado de energía, inhibiendo las vías claves de biosíntesis y conservando, de este modo, el ATP (Marsin *et al.*, 2000).

Considerando la presencia de ácido ascórbico en nuestros extractos, también, en esta tesis se podría postular que el efecto cardioprotector observado podría ser asociado al aumento de la actividad de la eNOS por este mecanismo (Figura 25).

En el presente trabajo se ha demostrado la mayor capacidad antioxidante del extracto acuoso de *I. brasiliensis* en algunos ensayos *in vitro* (peroxinitrito, ABTS y FRAP) respecto a *I. paraguariensis*. Esta capacidad antioxidante no correlacionó con una mayor actividad cardioprotectora.

Esta falta de correlación entre la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos y su actividad cardioprotectora, también fue observada en trabajos realizados en nuestro laboratorio con extractos de vino tinto y extractos enriquecidos en polifenoles de cacao.

Efectivamente, los tres extractos no alcohólicos de vino tinto ensayados (Malbec, Cabernet Sauvignon y générico) mostraron una capacidad antioxidante *in vitro* similar. Sin embargo, sólo los extractos de los vinos Malbec y Cabernet Sauvignon resultaron cardioprotectores (Mosca *et al.*, 2001). El ensayo con los extractos de cacao demostró una gran actividad antioxidante *in vitro* de los mismos (Schinella *et al.*, 2010), aunque ninguno de ellos tuvo efecto cardioprotector (dato no publicado).

En 2004, Angelo Azzi comenzó a cuestionar varios aspectos de la solidez de la "hipótesis antioxidante" e invitó a abrir un foro de discusión sobre las concepciones referidas a los términos antioxidante y estrés oxidativo; así como también, sobre el grado de fiabilidad de los ensayos *in vitro* en la evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos o extractos (Azzi *et al.*, 2004).

En la misma perspectiva, Barry Halliwell, un referente científico en el estudio de los antioxidantes y la actividad biológica utilizando diferentes modelos experimentales, también comenzó a publicar artículos que desafían los conceptos tradicionales de antioxidantes y estrés oxidativo. (Halliwell, 2007; Gutteridge & Halliwell, 2010; Halliwell, 2011; Halliwell, 2012; Halliwell, 2013). En estos artículos, Halliwell cuestiona el efecto protector de los polifenoles en ciertas enfermedades, a menudo atribuido a sus potentes actividades antioxidantes *in vitro* y, también señala la falta de eficacia de la terapia antioxidante en diferentes ensayos clínicos.

Más recientemente, Fraga *et al.* (2014), describen algunas desventajas de la determinación de la actividad antioxidante total en diferentes sistemas biológicos. Entre las principales, señalan; por una parte, que los diferentes ensayos se correlacionan pobremente y si bien, estos ensayos son capaces de detectar una combinación particular de compuestos, excluyen la contribución de las enzimas antioxidantes y otros antioxidantes indirectos. Por otra parte; los datos relativos a la capacidad antioxidante de los alimentos mediante métodos *in vitro* (tubo de ensayo) no se pueden extrapolar *in vivo* a la salud humana. Los autores

sugieren que los métodos para la determinación de la actividad antioxidante total pueden usarse sólo bajo condiciones muy controladas y proporcionan resultados cuya interpretación deben considerarse teniendo en cuenta las características del modelo estudiado.

En atención a los cuestionamientos de Azzi, Halliwell y Fraga, resulta necesario reparar en la capacidad potencial de algunos compuestos del extracto de *I. brasiliensis* para interactuar con proteínas y generar respuestas celulares que permitan reducir el daño oxidativo.

En este estudio se demuestra, por primera vez, la acción cardioprotectora de un extracto acuoso de *I. brasiliensis* en un modelo de isquemia y reperfusión puesta de manifiesto en el aumento de la recuperación post-isquémica y en la disminución del daño oxidativo observados en el corazón aislado (Figura 24); lo que conduce a afirmar que el extracto posee actividad antioxidante en el modelo experimental utilizado.

La hipótesis formulada en este trabajo ha sido verificada, por cuanto se ha visto que el extracto acuoso de *I. brasiliensis* posee la capacidad de atenuar las alteraciones funcionales y el daño oxidativo en un modelo fisiopatológico donde la especies reactivas del oxígeno desempeñan un papel importante.

Por lo expuesto, los datos aportados por esta tesis indican que *I. brasiliensis* tiene efectos antioxidantes y cardioprotectores (*ex vivo*) similares a *I. paraguariensis* diferenciándose primordialmente en la presencia de cafeína. Este hecho convierte potencialmente a *I. brasiliensis* en una opción dietética al consumo de *I. paraguariensis* (yerba mate), debido a que proporciona todos los efectos bioquímicos y farmacológicos, sin la acción psicoestimulante o cardioestimulante de la cafeína. De este modo, es posible proyectar una aplicación de *I. brasiliensis* en el mercado nutracéutico como alternativa de dieta “saludable”, en el marco de una sociedad cada vez más consciente de los efectos preventivos de los ingredientes alimentarios.

Como corolario de esta discusión se proponen cuatro mecanismos cardioprotectores del extracto acuoso de *I. brasiliensis* (Figura 25), que pueden servir de fundamento para la generación de nuevas hipótesis en futuros estudios, a saber:

- ✓ La activación de un receptor acoplado a proteína G que active la vía PI3K/Akt/eNOS.
- ✓ La activación de la expresión génica de enzimas de la vías PI3K/Akt/eNOS.
- ✓ La activación directa o indirecta de la actividad de la eNOS por el ascorbato.

- ✓ La capacidad de atrapar radical superóxido y peroxinitrito que reduciría el daño producido por las ERO y aumentaría la biodisponibilidad de NO.

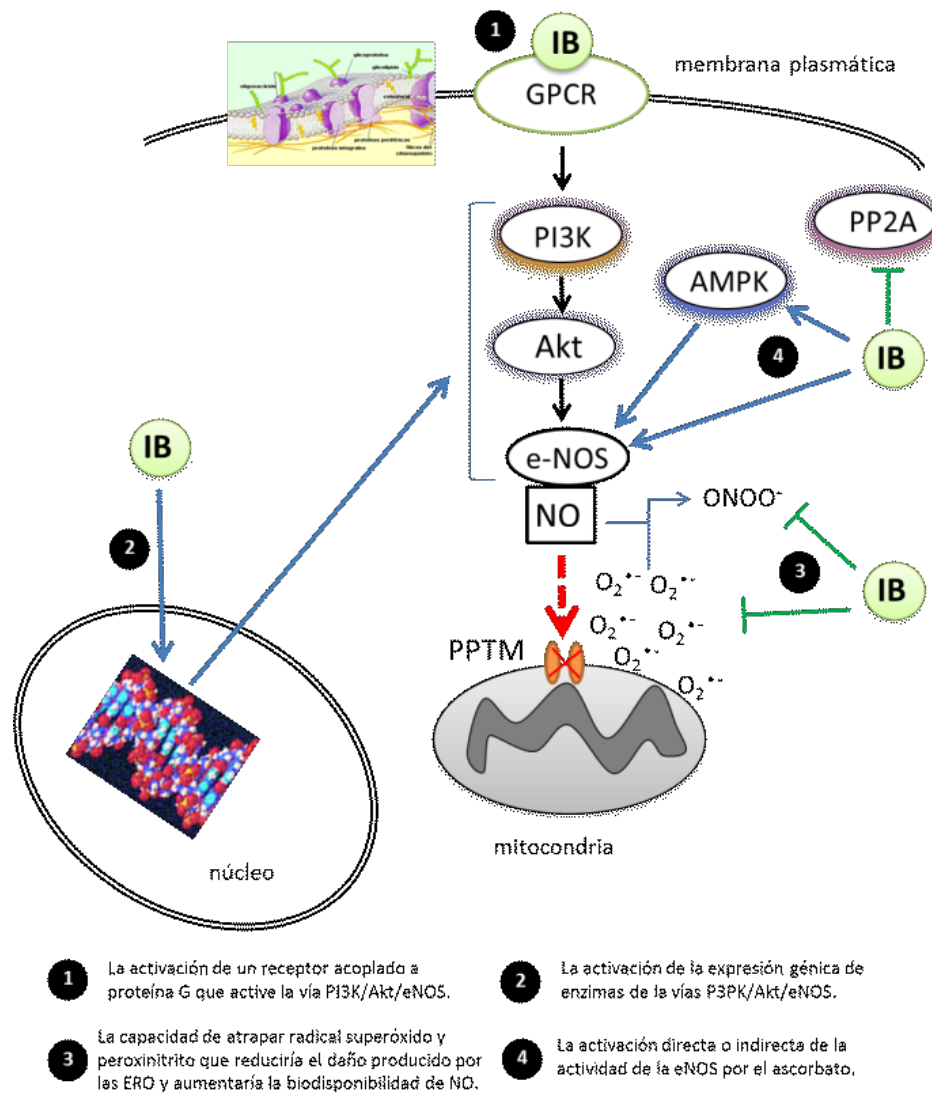


Figura 25. Posibles mecanismos involucrados en la cardioprotección de *Ilex brasiliensis* (IB) en un modelo de isquemia global en corazón aislado de rata.

VIII. Conclusiones

- ✓ El análisis micrográfico de las hojas posibilitó la caracterización de *I. brasiliensis* en comparación con *I. paraguariensis*. Se distinguieron caracteres morfoanatómicos diferenciales entre los que se destacan: los tipos de estomas, el número de hileras de parénquima en empalizada, la posición de las drusas en el mesófilo, la estructura del haz vascular y la vaina de esclerénquima de la vena media foliar.
- ✓ El extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* posee una mayor concentración de fenoles totales y ácido ascórbico que *I. paraguariensis*.
- ✓ El extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* no contiene cafeína. Esto representa otra característica fitoquímica diferencial respecto de *I. paraguariensis*.
- ✓ La composición química del extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* contiene una mayor variedad de flavonoides derivados de quercetina y kaempferol que *I. paraguariensis*, destacándose la presencia de una monohexosa de quercetina.
- ✓ El extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* posee una elevada actividad antioxidante *in vitro* como atrapador de radicales libres estables (DPPH y ABTS) y de especies reactivas de oxígeno (superóxido y peroxinitrito).
- ✓ El extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* inhibe la peroxidación lipídica enzimática y no enzimática de microsomas hepáticos de rata y protege a las LDL de la peroxidación lipídica inducida por cobre.
- ✓ El extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* disminuye las alteraciones post-isquémicas de la función miocárdica y el daño oxidativo generado por el proceso de isquemia y reperfusión.
- ✓ Los mecanismos cardioprotectores del extracto acuoso de hojas de *I. brasiliensis* son dependientes de la actividad de la NOS.

IX. Bibliografía

- Andújar I, Schinella GR, Ríos JL. “Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*): A Psycho-stimulant Plant with Anti-oxidant Properties”. In: Polyphenols: Food Sources, Bioactive Properties and Antioxidant Effects (Dean T. Cobb, Ed.), Nova Science Publishers. New York, USA. 2014. pp. 51-86.
- Anesini C, Turner S, Cogoi L, Filip R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). LWT - Food Sci Technol. 2012; 45: 299-304.
- Arnao M, Cano A, Acosta M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. Free Rad Res. 1999; 31: S89-S96.
- Aruoma OI. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutat Res. 2003; 523-524: 9-20.
- Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food Chem Toxicol. 1994; 32 (7): 671–683.
- Azzi A, Davies KJ, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. FEBS Lett. 2004; 558: 3-6.
- Balavoine GG, Geletii YV. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. Part I: convenient assay. Nitric Oxide. 1999; 3(1): 40-54.
- Barg M, Rezin GT, Leffa DD, Balbinot F, Gomes LM, Carvalho-Silva M, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Streck EL, Andrade VM. Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation. Environ Toxicol Pharmacol. 2014; 37(1): 195-201.
- Bastos DHM, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, de Oliveira Carvalho P, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*) extracts. Molecules. 2007; 12: 423-432.
- Belay A, Turea K, Redib M, Asfawa A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. Food Chem. 2008; 108: 310–315.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “anti-oxidant power”: The FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239(1): 70-76.
- Bixby M, Spieler L, Menini T, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. Life Sci. 2005; 77: 345-358.
- Bolli R. Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis. A brief review of the evidence demonstrating a major role of reactive oxygen species in several forms of postischemic dysfunction. Basic Res Cardiol. 1998; 93: 156-162.

- Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 1897-918.
- Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash S, Menini T, Gugliucci A, Nunes E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Med.* 2003; 9: 379-387.
- Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol.* 2011; 136(3): 378-84.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u Technol.* 1995; 28: 25-30.
- Bravo L, Goya L, Lecumberri E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Res Int.* 2007; 40: 393-405.
- Brewer MS. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2011; 10: 221-247.
- Burkitt MJ, Gilbert BC. Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Rad. Res. Commun.* 1990; 10(4-5): 265-280.
- Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51: 15-25.
- Carpano SM, Spegazzini ED, Nájera MT. Nueva técnica de eliminación de cutina de órganos foliares. *Rojasiana.* 1994; 2: 9-12.
- Chandra S, Gonzalez de Mejia E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 3583-3589.
- Choi YH, Sertic S, Kim HK, Wilson EG, Michopoulos F, Lefeber AW, Erkelens C, Prat Kricun SD, Verpoorte R. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(4): 1237-1245.
- Cos P, Calomme M, Pieters L, Vlietinck J, Vanden Bergh D. Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. In: *Studies in Natural Products Chemistry (Vol. 22)*, Atta-ur-Rahman (Ed.), Elsevier, Amsterdam. 2000. pp. 307-341.
- Cuénoud P, del Pedro Martínez MA, Loizeau PA, Spichiger R, Andrews S, Manen JF. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Ann Bot.* 2000; 85: 111-122.

- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 135-159.
- Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom.* 2004; 39: 1-15.
- D'Ambroggio de Argueso A. Manual de técnicas en la histología vegetal. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires. 1986.
- Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. (2006). Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol.* 38: 414-419.
- Debenedetti SL, Ferraro GE, Coussio JD. Flavonoles aislados de *Pterocaulon virgatum* (L) D C. *Acta Farm Bonaerense.* 1983; 2: 1-3.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 1768-1774.
- Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, Zweier JL. Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 15081-15086.
- Fantinelli JC, Schinella G, Cingolani HE, Mosca SM. Effects of different fractions of a red wine non-alcoholic extract on ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2005; 76: 2721-2733.
- Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res.* 2000; 20: 1437-1446.
- Filip R, Ferraro G, Manuele MG, Anesini C. *Ilex brasiliensis*: phytochemical composition and mechanism of action against the proliferation of lymphoma cell line. *J Food Biochem.* 2008; 32: 752-765.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408: 239-247.
- Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011; 194: 7-15.
- Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta*;1840: 931-934
- Galle FC. *Hollies: the genus Ilex*. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 1997.
- Gattuso M. Micrografía analítica y la farmacobotánica. *Dominguezia.* 2013; 29: 5 -6.
- Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein: insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11: 103-112.

- Giberti G. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteración. *Dominguezia*. 1989; 7: 1–22.
- Giberti GC. Hallazgo de *Ilex brasiliensis* (Aquifoliaceae) en la Argentina. *Bol. Soc. Argen. Bot.* 1998; 33: 137-140.
- Giner RM, Recio MC, Cuellar MJ, Máñez S, Peris JB, Stübing G, Rios JL. A taxonomical study of the subtribe Leontodontinae based on the distribution of phenolic compounds. *Biochem Sys Ecol.* 1993; 21: 613–616.
- Góngora L, Giner RM, Máñez S, Recio MC, Schinella G, Ríos JL. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. *Life Sci.* 2002; 71 (25): 2995-3004.
- González Arbeláez L, Fantinelli J, Schinella G, Mosca S. La vía Akt/eNOS/GSK-3-beta está involucrada en la disminución del tamaño del infarto producida por un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*. *Medicina (Buenos Aires)*. 2013; 73 (Supl. III): 273.
- Gorne Viani RA, Santos Vieira AO. Flora arbórea da bacia do rio Tibagi (Paraná, Brasil): Celastrales sensu Cronquist. 2007; *Acta Bot Bras.* 21: 457-472.
- Gottlieb AM, Giberti GC, Poggio L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern south America, evidence from AFLP and its sequence data. *Am J Bot.* 2005; 92: 352–369.
- Graham H. Mate. In *The methylxanthine beverages and foods: Chemistry, consumption and health effects*, Spiller, G. A. Ed.; Alan R. Liss, New York. 1984. pp. 179-183.
- Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 224: 338-344.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393: 561-564.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: Simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 1987; 165: 215–219.
- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun.* 1990; 9: 1-32.
- Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection?. *Drugs.* 1991; 42: 569-605.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 125-126.
- Halliwell, B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?. *Cardiovasc Res.* 2007; 73: 341-347.

- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32: 125-130.
- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012; 70: 257-265.
- Halliwell, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now?. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 75: 637-644.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Bacterial killing inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998; 92: 3007-3017
- Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Dis Today.* 2008; 13: 894-901.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2007; 12: 217-234.
- Heck CI, de Mejia E G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*), a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007; 72: R138-R151.
- Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-Ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J. Biol Chem.* 2001; 276: 40-47.
- Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: Nitric Oxide, Protein Kinases, and Mitochondria. *Circulation.* 2008; 118: 1915-1919.
- Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411: 378-384.
- Inder RE, Bray BJ, Sipes IG, Rosengren RJ. Role of cytochrome P4502E1 in retinol's attenuation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the Swiss Webster mouse. *Toxicol Sci.* 1999; 52: 130-139.
- Instituto de Botánica Darwinion. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. (ISSN 2250-6365). 1997-2013. <http://www2.darwin.edu.ar>
- Ji HF, Li XJ, Zhang HY. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?. *EMBO Rep.* 2009; 10: 194-200.
- Jiao K, Mandapati S, Skipper PL, Tannenbaum SR, Wishnok JS. Site-selective nitration of tyrosine in human serum albumin by peroxynitrite. *Anal Biochem.* 2001; 293: 43-52.
- Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15: 1749-1770.

- Kim HK, Saifullah, Khan S, Wilson EG, Kricun SD, Meissner A, Goraler S, Deelder AM, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry*. 2010; 71: 773-784.
- Kim JS, Ohshima S, Padiaditakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37: 1943-1950.
- Ladurner A, Schmitt CA, Schachner D, Atanasov AG, Werner ER, Dirsch VM, Heiss EH. Ascorbate stimulates endothelial nitric oxide synthase enzyme activity by rapid modulation of its phosphorylation status. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52: 2082-2090.
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
- Lopes GKB, Schulman HM, Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1472: 142-152.
- Lopera YE, Fantinelli J, González Arbeláez LF, Rojano B, Ríos JL, Schinella G, Mosca SM. Antioxidant activity and cardioprotective effect of a non-alcoholic extract of *Vaccinium meridionale* Swartz during ischemia-reperfusion in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; Article ID 516727.
- López-Alarcón C, Denicola A, Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*. 2013; 763: 1-10.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
- Lu L, Song F-R, Tsao R, Jin Y-R, Liu Z-Q, Liu S-Y. Studies on the homolytic and heterolytic cleavage of kaempferol and kaempferide glycosides using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010; 24: 169-172.
- Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*. 2000; 10: 1247-1255.
- Metcalf CR & Chalk L. *Anatomy of Dicotyledons I*. Oxford University Press. London, UK. 1979.
- Mosca SM, Schinella GR, Tournier HA, Cingolani HE. Is the protection against ischemia induced by red wine linked to its antioxidant capacity?. *Exp Clin Cardiol*. 2001; 6:183-187.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63
- Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*. 2008; 88: 581-609.

- Pannala AS, Chan TS, O'Biren J, Rice-Evans C. Flavanoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Comm.* 2001; 282: 1161-1168.
- Perricone AJ, Vander Heide RS. Novel therapeutic strategies for ischemic heart disease. *Pharmacol Res.* 2014; 89C:36-45.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000; 63: 1035-1042.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005; 43: 4290-4302.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységú L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew Chem Int Ed.* 2011; 50: 586 – 621.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24: 981-990.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997; 2: 152-159.
- Rivelli DP, Silva VV, Ropke CD, Miranda DV, Almeida RL, Sawada TCH, Barros SBM. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH[•] reduction. *Rev Bras Cienc Farm.* 2007; 43: 215-222.
- Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2-4 dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem.* 1943; 147: 399-407.
- Salisbury EJ. On the cause and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. *Phil Trans R Soc Lond B.* 1927; 216: 1-65.
- Scala AC. Contribución al conocimiento histológico de la yerba mate y sus falsificaciones. *Revista del Mus La Plata.* 1921; 26: 69-165.
- Schinella GR, Tournier HA, Buschiazzi HO, de Buschiazzi PM. Effect of arsenic (V) on the antioxidant defense system: in vitro oxidation of rat plasma lipoprotein. *Pharmacol Toxicol.* 1996; 79: 293-296.
- Schinella GR, Troiani G, Dávila V, de Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 269: 357-360.
- Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nutr.* 2005; 24: 360-366.
- Schinella GR, Tournier HA, Mañez S, de Buschiazzi PM, Recio MC, Ríos JL. Tiliroside and gnapthaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. *Fitoterapia.* 2007; 78: 1-6.

- Schinella GR, Fantinelli JC, Tournier HA, Prieto JM, Spegazzini E, Debenedetti S, Mosca SM. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). *Food Res. Int.* 2009; 42: 1403-1409.
- Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MA, Muguerza B, Ramón D, Ríos JL. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Res Int.* 2010; 43: 1614-1623.
- Schinella G, Neyret E, Cónsole G, Tournier H, Prieto J, Ríos J, Giner R. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. *Planta Med.* 2014; 80: 961-968.
- Schumacker PT. Nitric oxide quenches the fire in heart mitochondria. *Nat Med.* 2013; 19(6):666-667.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16: 144-158
- Spegazzini ED, Castro MT, Carpano SM, Nájera MT. Taxonomic determination of therapeutic argentine species of *Ilex*. *Pharmaceutical Biol.* 2002; 40: 2-15.
- Squadrito GL, Jin X, Pryor WA. Stopped-flow kinetic study of the reaction of ascorbic acid with peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 322: 53-59.
- Strittmatter C. Modificación de una técnica de coloración Safranina Fast Green. *Bol Soc Arg Bot.* 1979; 18: 121-122.
- Sugimoto S, Nakamura S, Yamamoto S, Yamashita C, Oda Y, Matsuda H, Yoshikawa M. Brazilian natural medicines. III. structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2009; 57: 257-261.
- Sun J, Murphy E. Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res.* 2010; 106: 285-296
- Tiberti LA, Yariwake JH, Ndjokob K, Hostettmann K. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2007, 18: 100-105.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera-del Valle N, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1343-1374.
- Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MKT, Mazura M, Tesler J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
- WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 1. World Health Organization, Geneva. 1999.

- Vieira MA; Maraschin M, Pagliosa CM, Podestá R, de Simas KN, Rockenbach II, Amboni RD, Amante ER. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. J Food Sci. 2010; 75: C280-C285.
- Wilkinson HP. The plant surface (mainly leaf), en: Metcalfe CR & Chalk L. (ed.) Anatomy of the Dicotyledons, Clarendon Press. Oxford, UK. 1979. pp. 97–165.
- Zampini IC, Isla MI, Schmeda-Hirschmann G. Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of *Baccharis incarum* (WEDD.) Perkins. J Chil Chem Soc. 2009; 54: 477-481.
- Zhang HY, Chen LL, Li XJ, Zhang J. Evolutionary inspirations for drug discovery. Trends Pharmacol Sci. 2010; 31: 443-448.
- Zornig H, Weiss G. Beiträge zur anatomie des laubblattes offizineller und pharmazeutisch gebräuchlicher compositen-drogen. Arch Pharm Berl. 1925; 263: 451-470.