



# Efecto de extractos de vegetales argentinos sobre el estado redox y neuroinmune en un modelo Murino de Cáncer

**María Cecilia Cittadini.**

Tesis-Doctor en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud, 2018

Aprobada: 2018

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Efecto de extractos de vegetales argentinos sobre el estado redox y neuroinmune en un modelo Murino de Cáncer por María Cecilia Cittadini se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



**FCM**  
Facultad de  
Ciencias Médicas



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**EFEECTO DE EXTRACTOS DE VEGETALES ARGENTINOS  
SOBRE EL ESTADO REDOX Y NEUROINMUNE  
EN UN MODELO MURINO DE CANCER**

**Trabajo de Tesis para optar al título  
de Doctor en Ciencias de la Salud**

**María Cecilia Cittadini**  
Lic. en Nutrición

**CÓRDOBA**  
**REPÚBLICA ARGENTINA**  
**2018**

## **Comisión de Seguimiento de Tesis**

**Director**

**Prof. Dr. Elio A. Soria**

**Co-Director**

**Prof. Dr. Pablo Gastón Repossí Márquez**

**Integrantes**

**Dra. Nilda Perovic**

**Prof. Dra. María Daniela Defagó**

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS” (Artículo 43° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud).

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda económica de Becas de Postgrado otorgadas por el Instituto Nacional del Cáncer (INC - Ministerio de Salud de la Nación); Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (FCM - UNC; Ministerio de Educación de la Nación) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El trabajo de investigación fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNC, Instituto Nacional de la Yerba mate (INYM), CONICET, FONCYT-MINCYT.

A su vez, parte del trabajo se llevó a cabo en colaboración con la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Salamanca y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España.



## **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido posible gracias a distintas Instituciones Públicas y a la participación y acompañamiento de muchas personas, fundamentales para llegar hasta aquí.

Agradezco a la Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Nutrición y Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud por otorgarme la formación profesional alcanzada de manera libre y gratuita.

Quiero agradecer a Elio, mi director, por enseñarme cada paso de esta carrera con su enorme generosidad y humildad, por enseñarme de valores y vocación. Agradezco a cada uno de mis compañeros: Agus, Ale, Ana, Pola, Valen, Luchi por los momentos de risas y mates, porque cada día fue una anécdota que compartiré y recordaré siempre. Les agradezco la contención, la compañía de todos estos años. Juntos logramos superar los obstáculos de la ciencia e hicimos que el aprendizaje sea productivo para todos.

A mi codirector Gastón, por enseñarme con dedicación y simpleza, por su paciencia todos estos años. A Nilda y Dani, por guiarme en el camino, con dedicación y entusiasmo, por su respeto y cariño.

Agradezco especialmente a Mirta Valentich, por acompañarme desde el comienzo con su enorme cariño y generosidad. También agradezco especialmente a Dolo Román, que me ha guiado en mis comienzos con la bondad y la calidez que la caracteriza.

Durante estos años fueron muchas las personas que alegraron cada día, que me ayudaron a resolver y mejorar mi trabajo: gracias a los compañeros de Epi, donde conocí grandes amigos: Ger, Cami, Juli, Nati, Leo y Dolo. A los compañeros del Instituto: Evange, Fer, Euge, Mariana, Patri, Mele, Marce y a todas las personas del sector B que me ha acompañado estos años. Gracias por la contención, las charlas llenas de risas y por cada momento compartido. A los compañeros de doctorado, por los hermosos recuerdos de esta etapa compartida.

A mis padres y mis hermanas que han sido el pilar en este y todos los caminos de mi vida, por su admiración constante y por ayudarme a creer que todo es posible. A Cristóbal y Nicanor por alegrarme la vida. A Agos por creer en mí siempre. A mi adorada tía Susana, por su ejemplo de lucha y su amor incondicional. Al resto de mi familia, que ha sabido acompañarme celebrando mis logros con mucho cariño. A Pao, amiga incondicional, por alentarme y apoyarme en cada momento, y a todas mis amigas de la vida por acompañarme siempre.

***“El agradecimiento es la memoria del corazón”***

***Lao Tse***

*Dedicado a  
Mis padres, hermanas, Quito y Nanor  
y a mi querida tía Susana*



## ÍNDICE

Resumen .....	16
Abstract .....	18
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN .....	20
1.    Potencial de la flora nativa argentina.....	20
1.1.    Fitoquímicos.....	21
Polifenoles .....	22
Vía de síntesis de compuestos fenólicos.....	23
Alimentos fuente de compuestos fenólicos.....	25
Ingesta de compuestos fenólicos .....	26
Biodisponibilidad de compuestos fenólicos.....	27
1.2.    Efecto protector de compuestos fenólicos en salud humana.....	29
<i>Acción antioxidante</i> .....	29
<i>Acción anti-inflamatoria</i> .....	32
<i>Modulación de la apoptosis</i> .....	34
1.3.    Sistema Nervioso Central .....	35
Estructura encefálica .....	35
Glia.....	37
Barrera hematoencefálica .....	38
1.4.    Cáncer .....	39
Cáncer de pulmón .....	39
1.5.    Efecto neuroprotector de polifenoles.....	40
1.6.    Hipótesis y Objetivos .....	42
Hipótesis .....	42
Objetivos.....	42
Capítulo 2 . MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.    Materiales y equipamiento .....	43
2.1.    Caracterización analítica de extractos.....	44

Obtención y preparación.....	44
Análisis por HPLC-DAD-MS de fitoextractos .....	44
Identificación y cuantificación fenólica .....	45
2.2. Ensayo <i>in vitro</i> .....	46
Tratamiento de líneas celulares .....	46
Viabilidad celular .....	46
Determinación de Interleuquina 6 (IL-6) en sobrenadante de células .....	46
Perfil de ácidos grasos de células tratadas.....	47
Análisis estadístico multivariado .....	47
2.3. Diseños experimentales <i>in vivo</i> .....	48
Animales de experimentación.....	48
Ratones sanos expuestos a fitoextractos.....	49
Modelo murino de cáncer de pulmón .....	49
2.4. Determinaciones bioquímicas .....	50
Concentración de fenoles totales (FT) .....	50
Anión superóxido .....	51
Peróxidos.....	51
Actividad específica de enzima $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT).....	51
Perfil de ácidos grasos .....	52
Determinación de Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ) .....	52
Determinación de Interleucina 6 (IL-6) .....	52
Estudios histológicos .....	53
Densidad Celular.....	53
Nivel de mielina .....	53
Apoptosis.....	54
2.5. Análisis de compuestos fenólicos por HPLC en tejido nervioso.....	54
Preparación de muestras .....	54
Análisis HPLC-UV .....	55
Identificación y cuantificación fenólica.....	55
2.6. Análisis estadístico.....	55

Capítulo 3 RESULTADOS .....	56
3. Análisis fitoquímicos de los fitoextractos.....	56
3.1.....	56
Fitoquímica .....	56
- <i>Lantana Grisebachii</i> .....	56
- <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> .....	58
- <i>Ilex paraguariensis</i> .....	61
3.2. Bioactividad <i>in vitro</i> de los fitoextractos.....	69
Viabilidad celular .....	69
Liberación de IL-6 .....	69
Perfil de AG de células tratadas .....	70
3.3. Análisis de Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS).....	72
3.4. Bioactividad <i>in vivo</i> de los fitoextractos en ratones sanos .....	73
Tejido encefálico total.....	74
Cerebro.....	75
Telencéfalo .....	75
Diencefalo.....	76
Mesencefalo .....	76
Tallo encefálico.....	76
Cerebelo .....	77
Perfil de AG encefálicos.....	81
3.5. Bioactividad <i>in vivo</i> del extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> en un modelo oncológico .	84
Determinación de compuestos bioactivos y marcadores redox.....	84
Fenoles totales .....	84
Peróxidos lipídicos.....	84
Concentración de IL-6 y TNF $\alpha$ .....	85
Histología cerebral.....	87
3.6. Fitoquímica de cerebros analizados por HPLC .....	91
Capítulo 4 Discusión .....	96
Conclusiones.....	105

Bibliografía.....	106
Anexos .....	120

## Índice de Tablas

Tabla 1. Perfil fitonutricional de los extractos seleccionados .....	26
Tabla 2. Características cromatográficas (tR), espectro de masa, espectro UV ( $\lambda_{max}$ ), identificación tentativa y concentración de compuestos fenólicos (mg/g de extracto seco) en el extracto de <i>Lantana grisebachii</i> . .....	65
Tabla 3. Características cromatográficas (tR), espectro de masa, espectro UV ( $\lambda_{max}$ ), identificación tentativa y concentración de compuestos fenólicos (mg/g de extracto seco) en extracto de <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> .....	66
Tabla 4. Características cromatográficas (tR), espectro de masa, espectro UV ( $\lambda_{max}$ ), identificación tentativa y concentración de compuestos fenólicos (mg/g de extracto seco) en extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> . .....	68
Tabla 5. Biomarcadores redox en diferentes regiones encefálicas de ratones Balb/c sanos tratados con extractos vegetales .....	79
Tabla 6. Perfil de ácidos grasos de cerebro de ratones Balb/c tratados con extractos vegetales, agrupados en familias .....	82
Tabla 7. Perfil de ácidos grasos de cerebro de ratones Balb/c tratados con extractos vegetales.....	83
Tabla 8. Compuestos fenólicos identificados en tejidos de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	93

## Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación y estructura química de polifenoles dietarios .....	23
Figura 2. Biosíntesis de polifenoles en las plantas .....	25
Figura 3. Representación esquemática de la biodisponibilidad de polifenoles en animales.....	29
Figura 4. Esquema de diseños experimentales con ratones Balb/c.....	50
Figura 5. Análisis cromatográfico (HPLC) de extracto de <i>Lantana grisebachii</i> .....	58
Figura 6. Análisis cromatográfico (HPLC) de extracto de <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> .....	61
Figura 7. Análisis cromatográfico (HPLC) de extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	63
Figura 8. Viabilidad y liberación de IL-6 en células T98-G y C6 tratadas con distintas concentraciones de LG, ABQ o IP .....	70
Figura 9. Ácidos grasos agrupados por familias luego de los tratamientos con fitoextractos.....	71
Figura 10. AG agrupados en proinflamatorios y anti-inflamatorios observados luego de tratamientos con fitoextractos.....	73
Figura 12. Fenoles totales encefálicos en ratones Balb/c sanos que recibieron tratamiento con fitoextractos.....	74
Figura 13. Peroxidación encefálica total en ratones Balb/c sanos que recibieron tratamientos con fitoextractos.....	75
Figura 14. Concentración de fenoles totales en cada región cerebral estudiada de ratones Balb/c sanos de ambos sexos luego de la ingesta de extractos vegetales .....	78
Figura 15. Fenoles totales en telencéfalo y diencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón que recibieron por vía oral extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	84
Figura 16. Peróxidos lipídicos en telencéfalo y diencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón que recibieron por vía oral extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	85
Figura 17. Concentración de IL-6 en cerebro de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con <i>Ilex paraguariensis</i> .....	86
Figura 18. Concentración de IL-6 en sangre de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con <i>Ilex paraguariensis</i> .....	86
Figura 19. Concentración de TNF $\alpha$ en cerebro de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con <i>Ilex paraguariensis</i> .....	87
Figura 20. Mielinización en telencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con <i>Ilex paraguariensis</i> . .....	88
Figura 21. Neuronas de la corteza, teñidas con método Klüver Barrera de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados con <i>Ilex paraguariensis</i> . .....	89

Figura 22. Número de células y porcentaje de área en telencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados con <i>Ilex paraguariensis</i> .....	89
Figura 23. Células de materia gris de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados con extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	90
Figura 24. Células picnóticas en la corteza teñidas con H/E. ....	90
Figura 25. Número de células y porcentaje de área en telencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados con <i>Ilex paraguariensis</i> .....	91
Figura 26. Microfotografías representativas de telencéfalo en ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados con extracto de <i>Ilex paraguariensis</i> . ....	91
Figura 27. Estándares puros utilizados para identificar y cuantificar compuestos fenólicos en tejidos murinos. ....	93
Figura 28. Ácido clorogénico (Rt ≈ 7,17 min, HPLC-UV 280 nm) en ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados con <i>Ilex paraguariensis</i> .....	94
Figura 29. Quercetina (Rt ≈ 29,28 min, HPLC-UV 320 nm) en ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados con <i>Ilex paraguariensis</i> .....	95

## Resumen

*Antecedentes:* el potencial nutricional y farmacológico de las plantas autóctonas argentinas ha sido poco estudiado. Sin embargo, es conocido que el consumo de sus extractos modifica la biodisponibilidad de fitoquímicos en diferentes tejidos, entre ellos el Sistema Nervioso Central (SNC), blanco de numerosos procesos patológicos asociados a oxidación e inflamación como el cáncer. Éste compromete al SNC de manera primaria y/o secundaria siendo, ésta última, por un proceso metastásico (síndrome neoplásico) y/o inmunoendocrino (síndrome paraneoplásico) que incluyen estrés oxidativo y neuroinflamación. Entre los potenciales neuroprotectores provenientes de extractos vegetales, los polifenoles constituyen el mayor grupo antioxidantes con su reconocida habilidad para atravesar la barrera hematoencefálica y alojarse en el SNC luego de la ingesta de infusiones. El objetivo principal fue determinar el efecto del consumo de extractos vegetales acuosos derivados de plantas nativas argentinas sobre el SNC de un modelo murino de cáncer, en función de su actividad redox y potencial inmunomodulador. La importancia del tema radica en desarrollar estrategias nutricionales para prevenir y tratar la disfunción neurológica con compuestos presentes en especies vegetales (dieta o formulaciones farmacológicas). *Metodología:* se identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos (HPLC-DAD-MS) de tres especies vegetales nativas: *L. grisebachii* (LG), *A. quebracho-blanco* (AQB) e *I. paraguariensis* (IP). Se realizó un ensayo *in vitro* en células gliales T98-G (humanas) y C6 (ratón), evaluando viabilidad celular, perfil de ácidos grasos y liberación de interleuquina 6 (IL-6) tras tratamientos con los fitoextractos. Se desarrolló un primer ensayo con ratones Balb/c sanos ( $n \geq 3$ ) tratados por vía oral durante 30 días: C (agua sin tratamiento) ó 100 mg/Kg/día de extracto de LG, AQB o IP. En función de estos resultados, se realizó un segundo ensayo con ratones Balb/c inoculados con células LAC-1 (adenocarcinoma de pulmón), tratados por vía oral durante 21 días con 0 (control), 50 ó 100 mg/Kg/día de IP ( $n \geq 3$ ). Se analizaron regiones encefálicas (telencéfalo, diencefalo, cerebelo, mesencefalo y tallo encefálico). Se determinaron por espectrofotometría: fenoles totales, peróxidos, GGT, superóxidos; por ELISA la concentración de TNF- $\alpha$  e IL-6, mientras



que el perfil de AG (en líneas celulares y regiones encefálicas) se determinó por cromatografía de gases. La biodisponibilidad de polifenoles en cerebro se determinó por HPLC-UV. Se analizó histopatología en telencéfalo (densidad celular, pérdida de mielina y apoptosis). *Resultados:* Se determinaron 21 compuestos fenólicos en LG, principalmente iridoides, 31 compuestos en AQB, en su mayoría derivados hidroxibenzoicos y 23 compuestos en IP, principalmente derivados del ácido cafeoil-quinico (ácido clorogénico - AC). En el ensayo *in vitro*, LG no se relacionó con la liberación de IL-6, AQB aumentó su liberación e IP produjo una disminución de esta citoquina, asociada a un aumento del ácido graso palmitoleico ( $\omega$ -7). En el ensayo con ratones sanos, LG y AQB causaron desequilibrio fenólico y desencadenaron estrés oxidativo, mientras que IP mostró efectos redox diferenciales en las regiones encefálicas estudiadas, y el mejor perfil redox en encéfalo total. En el segundo ensayo murino, los ratones fueron inoculados con LAC-1. Se identificó AC y quercetina (Q) en las regiones del cerebro, hígado y tumor, de manera dependiente de la dosis de IP. El AC fue el principal compuesto encontrado en el cerebro, mientras que la Q se observó, en menor medida, en el diencefalo. Ambos compuestos redujeron la IL-6 en diencefalo, dependiente de la dosis de IP con respecto al control (9% y 29%, respectivamente,  $p < 0,05$ ). La histología sugirió protección celular con menos apoptosis en áreas expuestas a AC. Esto avalado por la desmielinización observada en los cerebros de los ratones sin tratamiento ( $p < 0,05$ ). *Conclusiones:* los resultados mostraron un efecto neuroprotector de IP, lo cual es relevante dado que es una planta ampliamente consumida por la población mundial. Su actividad neuroprotectora tiene un potencial de salud relevante al mejorar los efectos nocivos del cáncer, transferible al ámbito sanitario con importantes implicancias. De esta manera resulta relevante profundizar el estudio de IP para conocer la concentración adecuada y la biodisponibilidad de sus fitoquímicos potencialmente protectores en el SNC, reconocer sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios y generar nuevas estrategias quimiopreventivas a partir de la ingesta masiva y frecuente de *ilex paraguariensis* en la población argentina.

**Palabras claves:** polifenoles, *ilex paraguariensis*, Sistema Nervioso Central, ácido clorogénico, quercetina, nutrición.

## Abstract

Background: the nutritional and pharmacological potential of Argentine native plants has been studied very little. However, we already know that the consumption of its extracts modifies the bioavailability of phytochemicals in different tissues, among them—the Central Nervous System (CNS), which is a target of numerous pathological processes associated with oxidation and inflammation such as cancer. These processes involve the CNS in a primary and/or secondary way, the latter being due to a metastatic process (neoplastic syndrome) and/or immunoendocrine (paraneoplastic syndrome) that include oxidative stress and neuroinflammation. Among the neuroprotective potentials derived from plant extracts, polyphenols are the largest antioxidant group with their recognized ability to cross the blood-brain barrier and stay in the CNS after infusions. The main objective was to determine the effect of the consumption of aqueous plant extracts derived from Argentine native plants on the CNS of a murine model of cancer. The effect would be determined by its redox activity and immunomodulatory potential. The importance of this topic lies in developing nutritional strategies to prevent and treat neurological dysfunction with compounds present in plant species (diet or pharmacological formulations).

*Methodology:* phenolic compounds (HPLC-DAD-MS) were identified and quantified from three native plant species: *L. grisebachii* (LG), *A. quebracho-blanco* (AQB) and *I. paraguariensis* (IP). An *in vitro* assay was carried out on glial cells T98-G (human) and C6 (mouse), evaluating cell viability, fatty acid profile and release of interleukin 6 (IL-6) after treatments with phytoextracts. A first trial was developed with healthy Balb/c mice ( $n \geq 3$ ) treated orally for 30 days: C (untreated water) or 100 mg/Kg/day of LG, AQB or IP extract. Based on these results, a second test was performed with Balb/c mice inoculated with LAC-1 cells (lung adenocarcinoma), treated orally for 21 days with 0 (control), 50 or 100 mg/kg/day of IP ( $n \geq 3$ ). Brain regions were analyzed (telencephalon, diencephalon, cerebellum, mesencephalon and brainstem). They were determined by spectrophotometry: total phenols, peroxides, GGT, superoxide; TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations by ELISA, while the AG profile (in cell lines and encephalic regions) was determined by gas chromatography. The brain phenolic bioavailability was determined by HPLC-UV. Histopathology was

analyzed in telencephalon (cell density, loss of myelin and apoptosis). *Results:* We determined 21 phenolic compounds in LG, mainly iridoids, 31 compounds in AQB, mostly hydroxybenzoic derivatives and 23 compounds in IP, mainly derivatives of caffeoyl-quinic acid (chlorogenic acid - AC). In the *in vitro* assay, LG was not related to the IL-6 release, AQB increased release IL-6 and IP produced a decrease in this cytokine, associated with an increase in palmitoleic fatty acid ( $\omega$ -7). In healthy mice assay, LG and AQB caused phenolic imbalance and triggered oxidative stress, while IP showed differential redox effects in the brain regions studied, and the best redox profile in the total brain. In the second murine assay, the mice were inoculated with LAC-1. AC and quercetin (Q) were identified in the brain regions, liver and tumor, in a manner dependent on the IP dose. AC was the main compound found in brain, while Q was observed, to a lesser extent, in diencephalon. Both compounds reduced IL-6 in diencephalon, dependent on the IP dose with respect to control (9% and 29%, respectively,  $p < 0.05$ ). Histology suggested cellular protection with less apoptosis in areas exposed to AC. This is supported by the demyelination observed in brains of mice without treatment ( $p < 0.05$ ). *Conclusions:* the results showed a neuroprotective effect of IP, which is relevant given that it is a plant widely consumed by world population. Its neuroprotective activity has a relevant health potential to ameliorate the harmful effects of cancer, transferable to the health field with important implications. In this way it is relevant to deepen the study of IP to know the adequate concentration and bioavailability of its potentially protective phytochemicals in the CNS, to recognize its anti-oxidant and anti-inflammatory effects and to generate new chemopreventive strategies from the massive and frequent ingestion of *ilex paraguariensis* in the Argentine population.

**Keywords:** polyphenols, *ilex paraguariensis*, Central Nervous System, chlorogenic acid, quercetin, nutrition.

## Capítulo 1 INTRODUCCIÓN

### 1. Potencial de la flora nativa argentina

Las plantas autóctonas argentinas presentan un enorme potencial sanitario, que junto a numerosas especies de Latinoamérica han sido, durante muchos años, la principal fuente medicinal de las personas (White et al, 2004). Dentro del extenso territorio argentino, las plantas que habitan en la región montañosa del centro, específicamente la región fitogeográfica chaqueña, han sido poco estudiadas, a pesar de que representan cerca del 31% de la flora medicinal argentina (Golenioswky et al, 2006). Más específicamente, estudios científicos han identificado que la provincia de Córdoba incluye aproximadamente 669 taxones, donde las familias botánicas Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Euphorbiaceae y Solanaceae representan más del 50% del total de plantas medicinales de Córdoba (Barboza et al, 2006). En este orden, en áreas geográficas específicas más pequeñas, como es la “Sierra de Comechingones” se han identificado 65 familias y 149 géneros diferentes de plantas que actualmente se usan en la medicina tradicional, siendo Asteraceae, Verbenaceae, Fabaceae y Solanaceae las más representativas (Golenioswky et al, 2006).

En este contexto, se llevaron a cabo distintos trabajos de bioprospección para identificar plantas con potencial efecto antioxidante y xenohormético. Se ensayaron *in vivo* tres plantas autóctonas argentinas: *Lantana grisebachii* Stuck. (Verbenaceae), *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltld. (Apocynaceae) e *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae).

Lantana es un género de la familia Verbenaceae con más de 100 especies, en su mayoría americanas. *Lantana grisebachii* es un arbusto perenne autóctono, distribuido en distintas provincias argentinas (Catamarca, Chaco, Formosa, Tucumán, Córdoba, Entre Ríos, entre otras) principalmente en la región fitogeográfica chaqueña y abundante en las Sierras de Córdoba (Steibel, 1999). Dentro de sus propiedades medicinales, las infusiones de sus partes aéreas son estimulantes gastrointestinales ya que mejoran la eliminación de toxinas y poseen actividades antipiréticas y antimicrobianas (Barboza et al, 2009). Se reportan usos populares como capacidad sedativa, febrífuga, emética, antirreumática y diurética (Ratera

et al, 1980; Alonso et al, 2015; Borneo et al, 2007). Presenta un potencial inmunoactivo y previene, en ensayos *in vitro*, la nefrotoxicidad por arsénico (Soria et al, 2008).

*Aspidosperma quebracho-blanco* es una especie arbórea de la familia Apocynaceae, que habita en el centro de América del Sur. Es dominante en la región de Chaco semiárido y árido y abundante en Chaco húmedo, cuantioso en las Sierras de Córdoba (Demaio et al, 2015). Se le atribuyen efectos antiasmático, cicatrizante y febrífugo (Borneo et al, 2009). Muchas de sus propiedades medicinales se deben a la presencia de principios activos identificados como aspidospermina, quebrachamina, aspidosamina y quebrachina (Demaio et al, 2015).

*Ilex paraguariensis*, conocida como yerba mate, pertenece a la familia Aquifoleaceae y es una especie de origen sudamericano, que se encuentra fundamentalmente en la región oriental del Paraguay y en pequeñas zonas de Uruguay, sur de Brasil, litoral mesopotámico argentino y sur de Bolivia (Alonso et al, 2015). Sus hojas y tallos se consumen en forma de mate, infusión que se bebe con bombilla, de amplio consumo en Sudamérica. En Argentina, específicamente en la ciudad de Córdoba, estudios han registrado valores de consumo promedio igual a  $495 \pm 13$  mL/persona/día (Nclis et al, 2016). Numerosos estudios han demostrado sus propiedades en salud, regulando desequilibrios oxidativos y el metabolismo de los lípidos. Se ha reportado su acción estimulante, antioxidante, anti-inflamatoria, anticancerígena, entre otras (Alonso et al, 2015). Estas propiedades están relacionadas principalmente con sus fracciones bioactivas, representadas por metilxantinas, saponinas y polifenoles (Rocha et al, 2018).

Diversos estudios científicos han demostrado el efecto beneficioso de la ingesta de plantas silvestres para la salud humana, dado que su consumo mejora la biodisponibilidad de ciertos fitoquímicos en diferentes órganos, como hígado, riñón, cerebro, etc. (Albrecht et al, 2017; Andrade et al, 2011). Estos fitoquímicos, principalmente polifenoles, previenen y modulan procesos fisiopatológicos asociados a oxidación e inflamación que se desencadenan en patologías crónicas, como el cáncer (Vauzour et al, 2012).

### **1.1. Fitoquímicos**

## **Polifenoles**

Las compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo de numerosas sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal que se originan como producto de su metabolismo secundario, siendo indispensables para las funciones fisiológicas vegetales (Pandey et al, 2009; Tomás-Barberán et al, 2018). Éstos incluyen compuestos con estructuras moleculares diversas caracterizadas por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, algunas relativamente simples, como los ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos y flavonoides (Figura 1) (Quiñones et al, 2012; Spencer et al, 2008) hasta moléculas poliméricas de elevado peso molecular, como los taninos hidrolizables y condensados (Tomás-Barberán, 2003).

Pueden dividirse en subgrupos según su estructura. Los flavonoides, con estructura básica C6-C3-C6, incluyen antocianinas, flavonoles y flavonas, flavanonas e isoflavonas. Otro subgrupo importante es el de los fenil propanoides que incluye a los derivados de ácidos hidroxicinámicos como cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico. También tienen importancia los estilbenoides (resveratrol) y los derivados benzoicos como los ácidos gálico y elágico (Tomás-Barberán et al, 2003).

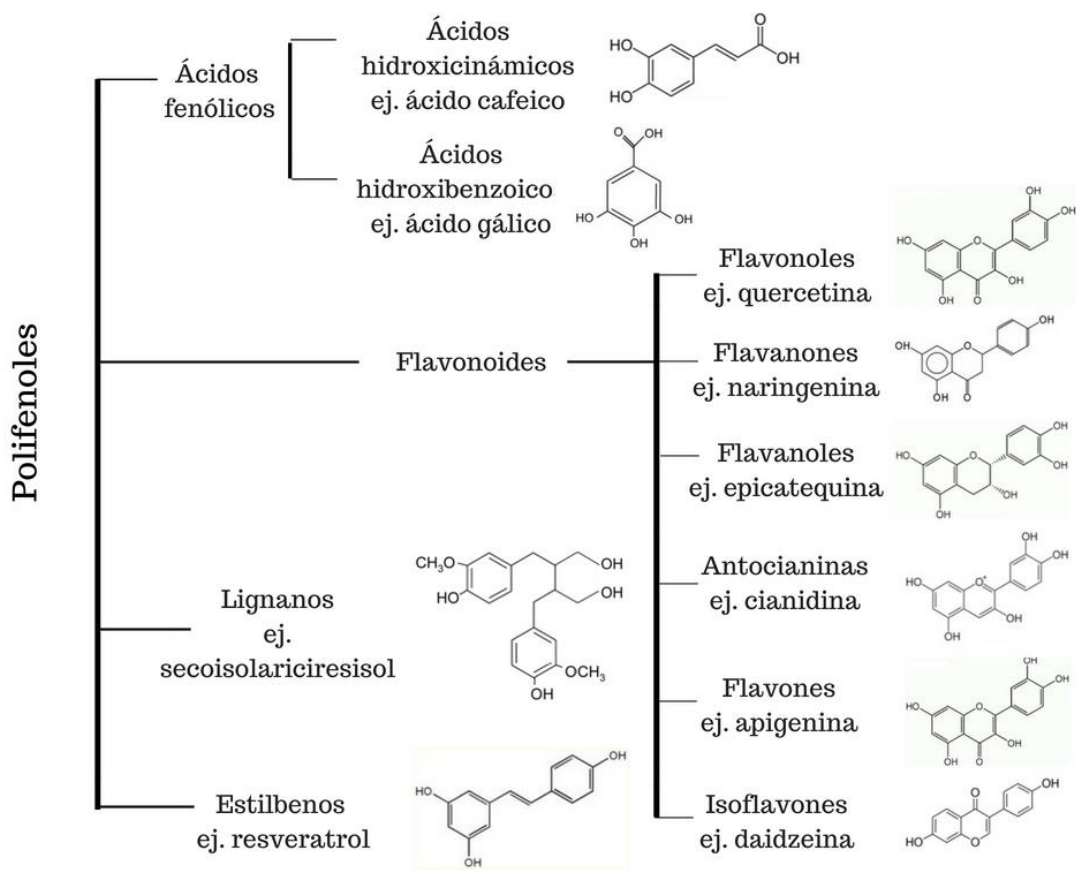


Figura 1. Clasificación y estructura química de polifenoles dietarios (adaptación de Spencer et al, 2008)

### Vía de síntesis de compuestos fenólicos

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Figura 2) (Quiñones et al, 2012). La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. Es dependiente de la luz y, a partir de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, como los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. También da origen a los ácidos cinámicos y sus derivados como fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y fenilpropanoides (Quiñones et al, 2012; Avalos García et al, 2009). Por otro lado, la vía de

los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Quiñones et al, 2012). La acción de la Coenzima A ligasa, transforma el ácido p-cumárico en p-cumaroil-CoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal. La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y seguida por una serie de condensaciones. Por reducción de éstos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas (Quiñones et al, 2012).

Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico como de la ruta de los poliacetatos. Es el caso de numerosas moléculas biológicamente activas, denominadas flavonoides, siendo las antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas las más abundantes (Avalos García et al, 2009). En la ruta de biosíntesis de flavonoides, en la primera etapa condensan 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA, catalizada por calcona-sintetasa, da lugar a naringerina calcona que es principal precursor de flavonoles y antocianinas. Si a esta misma condensación la cataliza la estilbeno-sintasa, conduce a la formación de estilbenos implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (Quiñones et al, 2012; Avalos García et al, 2009).



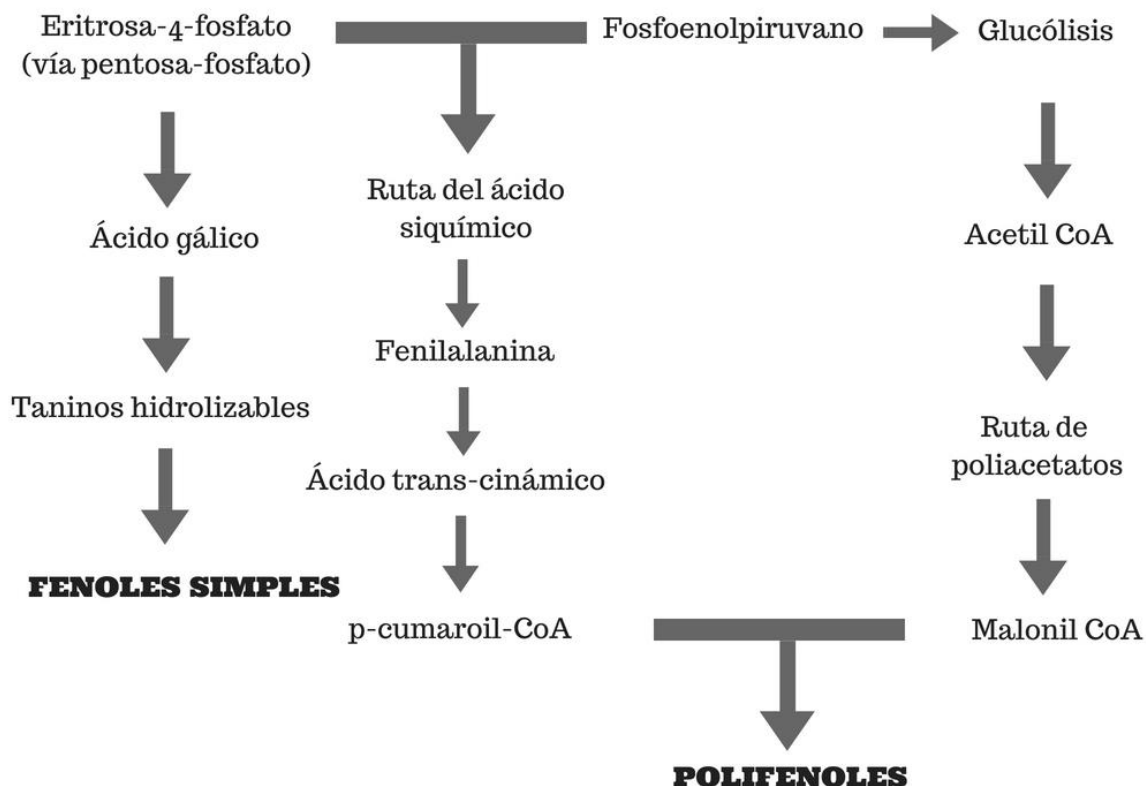


Figura 2. Biosíntesis de polifenoles en las plantas (adaptado de Quiñones et al, 2012).

### Alimentos fuente de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran en una amplia variedad de plantas comestibles, frutos, hortalizas, bebidas como té, café, cerveza y vino tinto, en el aceite de oliva, en cereales y en algunas semillas como las de leguminosas (Pandey et al., 2009; Estrella Pedrola, 2018). En la mayoría de los casos, los alimentos contienen mezclas complejas de polifenoles. En general, las partes aéreas de las plantas consumidas en forma de infusión (té) contienen apreciables cantidades de procianidinas y catequinas (Andrade et al, 2011; Pandey et al, 2009) mientras que los frutos contienen concentraciones relativamente altas de derivados de quercetina, kaempferol (flavonoles), y ácidos hidroxicinámicos (ácido gálico, cafeico, etc.) (Estrella Pedrola, 2018).

En cuanto a la presencia de compuestos fenólicos en plantas autóctonas argentinas, existe escasa evidencia científica. Si bien se han descripto cantidades de fenoles y de flavonoides totales de varias familias de plantas (Borneo et al, 2009), no se ha encontrado información

de caracterización fenólica específica de *Lantana grisebachii* y *Aspidosperma quebracho-blanco*. Por otro lado, el perfil de polifenoles de *Ilex paraguariensis* ha sido ampliamente estudiado dado su habitual consumo en la población sudamericana, reportando el ácido clorogénico como el principal ácido fenólico presente en esta planta (Bracesco et al, 2011; González de Mejía et al, 2010). Sin embargo, son escasos los reportes de caracterización y cuantificación fenólica de yerba mate obtenida de cultivos orgánicos (no comercial).

En la Tabla 1 se observan valores de fenoles totales, flavonoides totales y poder antioxidante de los extractos de plantas seleccionadas reportados en la bibliografía (Borneo et al, 2009; Albrecht et al, 2017).

Tabla 1. Perfil fitonutricional de los extractos seleccionados

<i>Extracto de plantas</i>	<i>Poder antioxidante*</i>	<i>Fenoles totales**</i>	<i>Flavonoides totales***</i>
<i>Lantana grisebachii</i>	351,30 ± 10,89	10,23 ± 0,43	5,98 ± 0,12
<i>A. quebracho-blanco</i>	234,30 ± 8,63	2,57 ± 0,14	0,97 ± 0,06
<i>Ilex paraguariensis</i>	1653,57 ± 24,86	21,77 ± 1,37	5,33 ± 0,13

\*Poder antioxidante determinado por la técnica de FRAP ( $\mu\text{mol}$  de Fe (II)/g de planta)

\*\* Fenoles totales: ( $\mu\text{g}$  EAG/g de extracto). EAG: equivalente de ácido gálico

\*\*\* Flavonoides totales: (mg de EQc/g de extracto). EQc: equivalente de quercetina

### **Ingesta de compuestos fenólicos**

La ingesta de compuestos fenólicos es difícil de establecer dado que no se conoce la cantidad de polifenoles contenida en muchos alimentos que forman parte de la dieta (Spencer et al, 2008, Pandey et al, 2009). Se ha estimado que los ácidos fenólicos podrían representar aproximadamente una tercera parte de los polifenoles ingeridos y los flavonoides los dos tercios restantes. No obstante, tanto la cantidad como la proporción de los diferentes polifenoles ingeridos varían ampliamente según el tipo de alimentos consumidos en función de los hábitos dietéticos (González-Paramas et al, 2018). Se estima

que el aporte de polifenoles se encuentra entre 50 y 800 mg/día, dependiendo del consumo de productos que lo contienen, principalmente las frutas y verduras (Estrella Pedrola, 2018).

### **Biodisponibilidad de compuestos fenólicos**

Se define biodisponibilidad como “la proporción de compuestos que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación” (Quiñones et al, 2012). El aprovechamiento nutricional de los polifenoles varía dependiendo del tipo de molécula. Se ha comprobado que no hay necesariamente relación directa entre la cantidad de fenoles en los alimentos, la cantidad ingerida y la biodisponibilidad en el cuerpo humano (Pandey et al, 2009; Spencer et al, 2008).

Naturalmente los compuestos fenólicos se encuentran unidos a glicósidos como agliconas, y así o en forma de metabolitos, pueden ser absorbidos en el intestino delgado. Sin embargo, la mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos en forma de ésteres, glucósidos o polímeros que no se puede absorber (Pandey et al, 2009). Antes de la absorción, estos compuestos deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microflora colónica. Luego de la absorción, los polifenoles se someten a modificaciones extensas siendo conjugados en las células intestinales y, más tarde, en el hígado por metilación, sulfatación y/o glucuronidación (Andrade et al, 2012; Quiñones et al, 2012). Como consecuencia, las moléculas que alcanzan la sangre y los tejidos son diferentes a las presentes en los alimentos (De Pascual-Teresa et al, 2014).

En general, los polifenoles consumidos son metabolizados como xenobióticos o sustancias extrañas para el organismo, similares a la mayoría de los fármacos. Esto lleva a cambios en la actividad biológica y produce un aumento en la tasa de excreción (Scheepens et al, 2010). Para producir sus efectos beneficiosos en tejidos ajenos al tracto gastrointestinal, estas moléculas xenobióticas deben ser absorbidas luego de la ingestión oral y ser transportadas por la corriente sanguínea desde el sitio de absorción a los tejidos y órganos diana. De este modo, para alcanzar concentraciones necesarias para su acción, los compuestos fenólicos deben superar distintas barreras. Primero, deben disolverse en los fluidos del tracto gastrointestinal y resistir el pH ácido estomacal. También pueden estar sujetos a degradación y metabolismo por enzimas intestinales, como las glucosidasas, esterasas,

oxidasas e hidrolasas que se originan tanto en el huésped como en la microbiota que habita en el tracto gastrointestinal. Un grupo de enzimas intestinales, las enzimas monoaminoxidasa (MAO), desaminan las monoaminas dietéticas y son un objetivo potencial para el diseño de sinergias (Scheepens et al, 2010). La mayor parte de la microbiota gastrointestinal reside en el intestino grueso y la velocidad y el alcance del metabolismo de las bacterias estará influenciada por la cantidad de polifenoles que llega al intestino distal. El metabolismo de los polifenoles por las enzimas colónicas puede ser también responsable de la destrucción de su bioactividad. Por ejemplo, muchos flavonoides de plantas existen en la forma O-glicósido dentro de la planta y se someten a hidrólisis para formar sus respectivos agliconas. Estos últimos son más lipófilos y más permeables a través de la membrana celular que el glicósido original, y por lo tanto se absorben más eficientemente a través de la pared intestinal. Sin embargo, las agliconas pueden necesitar una hidrólisis enzimática de la porción glucídica mediante glicosidasas antes de la absorción (González-Paramas, 2018; Santos-Buelga, 2001). Las agliconas de estos compuestos pueden ser conjugadas por UDP-glucuronosiltransferasas para formas glucurónidos y por sulfotranferasas para dar lugar a sulfatos en hígado (González-Paramas, 2018; Santos-Buelga, 2001). A su vez, la absorción favorable a través de la pared intestinal (generalmente por difusión pasiva por un gradiente de concentración o por un transportador de captación apropiado) no siempre equivale a una biodisponibilidad mejorada. Una vez en el enterocito, el polifenol puede estar sujeto a varias bombas de eflujo. De esta manera, si el polifenol supera los mecanismos de defensa del intestino, llegará al hígado, seguidamente ingresará a la circulación sistémica y se distribuirá por el torrente sanguíneo a los otros órganos principales del cuerpo y a los posibles sitios de acción (Figura 3). Los polifenoles pueden pasar con facilidad a través de los poros de los capilares de órganos como el corazón y los pulmones, pero no el cerebro. Los capilares del cerebro están rodeados por la barrera hematoencefálica protectora y rodeado también de células gliales, que da como resultado características de permeabilidad que se asemejan más a las de las paredes celulares de tejido fuertemente unidas. Para obtener acceso al cerebro, un polifenol debe ser altamente

lipofílico o estar sujeto a procesos de transporte de captación específicos (Scheepens et al, 2010).

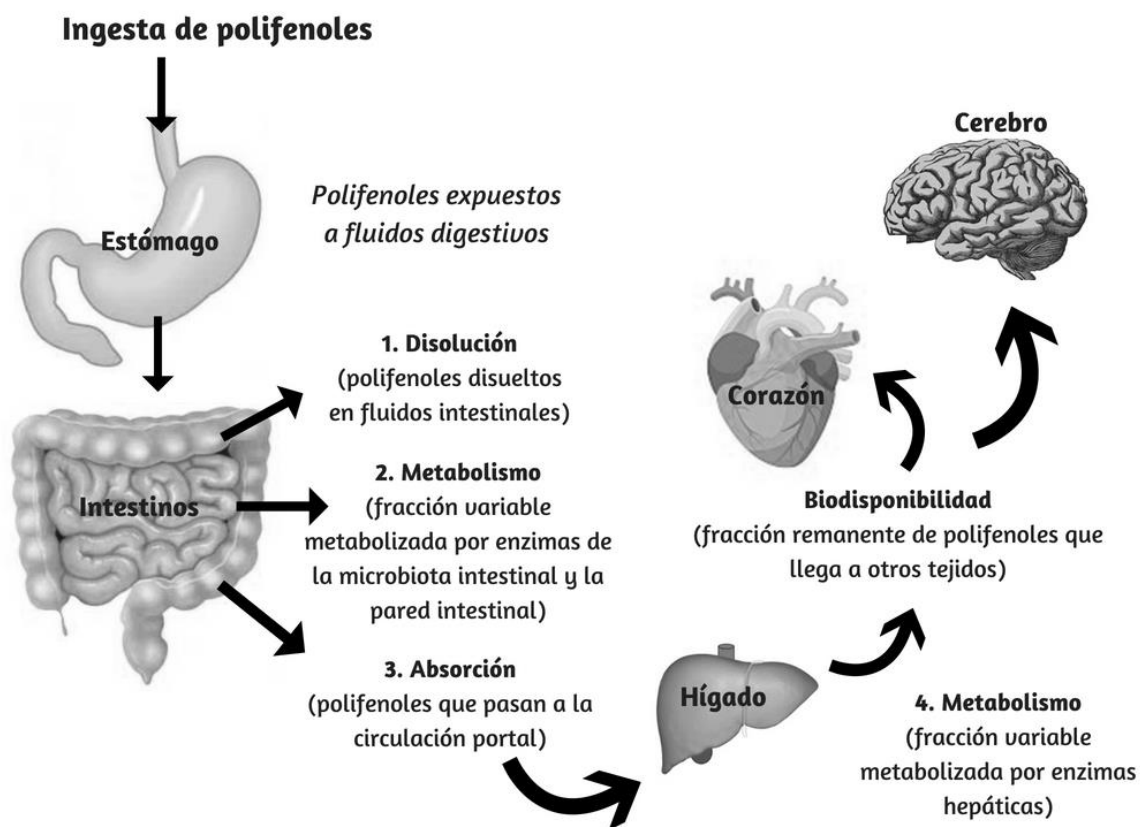


Figura 3. Representación esquemática de la biodisponibilidad de polifenoles en animales (adaptado de Scheepens et al, 2010 y Andrade et al, 2012).

## 1.2. Efecto protector de compuestos fenólicos en salud humana

### ***Acción antioxidante***

El estrés oxidativo (EO) es un proceso biológico complejo que implica la pérdida de la homeostasis redox (óxido-reducción) en células y tejidos, comprometiendo vías moleculares reguladoras y regulables por dicho fenómeno (Jones, 2006). Consiste en un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema biológico de neutralizar y reparar el daño (Jones, 2006). Si bien, las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y matar a los patógenos, la producción excesiva de

peróxidos y radicales libres produce efectos tóxicos que dañan los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN, inactivan enzimas y producen la oxidación de hormonas. El resultante es un daño estructural celular, mutaciones celulares, hasta la muerte celular.

Los mecanismos de acción por los cuales los polifenoles actúan como antioxidantes son:

- **Interacción directa con especies reactivas:** actúan como estabilizadores, lo cual supone la actividad quelante de radicales libres. Tal acción implica su estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas que permite que el radical libre pierda su condición por “apareamiento” de su electrón desapareado. Así el polifenol, como resultado de ceder un electrón, se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. A su vez, los polifenoles pueden estabilizar radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno. En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente (Jones et al, 2010; Hernández-García et al, 2010).
- **Adición directa del radical a su estructura:** pueden actuar estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica la adición directa del radical a su estructura química (Jones et al, 2010).
- **Prevención de la formación enzimática de especies reactivas:** los polifenoles inhiben ya sea la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas pro-oxidantes involucradas en la generación de especies reactivas, como la NADPH-oxidasa, la xantina-oxidasa, la mieloperoxidasa y la óxido nítrico sintasa (Barsano et al, 2009).
- **Activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes:** los compuesto fenólicos actúan sobre las enzimas superóxido-dismutasa (cobre/zinc y manganeso-dependientes) que reduce radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, catalasa (hierro-dependiente) que reduce peróxido de hidrógeno a agua, glutatión-peroxidasa (selenio-dependiente) que reduce lipo-hidroperóxidos a sus alcoholes correspondientes, glutatión-S-transferasa en su tipo peroxidasa que actúa reduciendo peróxidos orgánicos, y glutatión reductasa que reduce glutatión oxidado

a reducido. Actúan también sobre la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT) presente en las membranas celulares de muchos tejidos, incluyendo riñones, hígado, corazón y cerebro, involucrada en la transferencia de aminoácidos a través de la membrana celular y el metabolismo de los leucotrienos. Esta enzima interviene en el metabolismo del glutatión mediante la transferencia de la fracción glutamil a una variedad de moléculasceptoras como el agua, algunos L-aminoácidos y péptidos, dejando como producto la cisteína para preservar la homeostasis intracelular del estrés oxidativo (Huanqui-Guerra, 1997; Jones et al, 2010).

En general los compuestos fenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y actúan según los mecanismos mencionados. A su vez la solubilidad y los efectos estéricos de cada molécula pueden verse afectados por el tipo de estructura, como es el caso de los derivados glicosilados, lo que puede aumentar o disminuir la actividad antioxidante (Estrella Pedrola, 2018).

Dentro de los polifenoles, los flavonoides presentan bajo potencial redox (dado su grado de hidroxilación y posición de hidroxilos en su molécula), por lo cual son capaces de reducir las ROS, altamente oxidadas (Galleano et al, 2010).

La actividad de los ácidos fenólicos está también en función de los grupos hidroxilo del anillo aromático y de la unión de estos compuestos a ácidos orgánicos y/o a azúcares para formar ésteres. Los mecanismos por los que actúan estos compuestos varían dependiendo de su concentración y tipos de compuestos presentes en los alimentos (Estrella Pedrola, 2018).

A su vez, los procesos de oxidación afectan notablemente a las moléculas lipídicas, produciendo peroxidación lipídica. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres produciendo lipoperoxidación. Ésta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. En estos procesos, los polifenoles pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (Avello et al, 2006). Esto hace

relevante el estudio del cerebro ya que posee gran vulnerabilidad a daños oxidativos debido a su alta tasa metabólica y a niveles elevados de AGPI que lo constituyen.

### ***Acción anti-inflamatoria***

La inflamación es una respuesta inespecífica del organismo frente a las agresiones del medio y está generada por distintos agentes. La respuesta inflamatoria ocurre solo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado (Abbas et al, 2009). Es un proceso dinámico que involucra la síntesis de mediadores locales inflamatorios como las prostaglandinas inducidas por la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). La biosíntesis de prostaglandinas está regulada por la fosfolipasa A2, la cual cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana, permitiendo la formación de ácidos grasos libres, como el ácido araquidónico (AA) y lisofosfolípidos. Ambos metabolitos fosfolipídicos actúan como precursores de mediadores inflamatorios como los eicosanoides, asociados con desórdenes de tipo agudo, así como crónico (Muñoz-Velázquez et al, 2012).

Durante el proceso inflamatorio, los macrófagos son estimulados para producir óxido nítrico (NO), leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas y citoquinas como las interleuquinas (factor de necrosis tumoral alfa -TNF $\alpha$ -; IL-1 $\beta$ ; IL-6, IL-10, IL-12, etc.). Todas esas moléculas forman la respuesta inflamatoria, caracterizada por permeabilidad vascular aumentada y reclutamiento de células inflamatorias. Dentro de éstas, IL-10 y TNF- $\alpha$ , son mediadores de respuesta inflamatoria generalizada (De la Cruz Conde, 2014). Por otro lado, la expresión de IL-6 en los distintos tipos celulares suele ser inducida por algún tipo de daño o estrés celular, por ejemplo, por radiación UV, aumento de ROS o por otras citoquinas proinflamatorias. Esta inducción suele ser regulada a nivel transcripcional fundamentalmente por la actividad de los factores de transcripción: factor nuclear Kappa B (FN $\kappa$ B) y NF-IL-6 (De la Cruz Conde, 2014). Así, uno de los mecanismos de acción anti-inflamatoria de los polifenoles se relaciona con la inhibición o modificación de la vía de traslocación del FN $\kappa$ B (Salminen et al, 2012; Young-Joon et al, 2008). A diferencia de otros factores de transcripción, que generalmente se encuentran en el núcleo, el FN $\kappa$ B se localiza



en el citoplasma en un estado inactivo y necesita un estímulo específico para que pueda formar un complejo con una proteína inhibidora (I $\kappa$ B) para trasladarse al compartimiento nuclear e inducir la transcripción de genes proinflamatorios. Así se activan la transcripción de los genes tipo IL1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , citoquinas inflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2, IL-8, enzimas como lipooxigenasas (LOX), COX y el receptor de tromboxano, vías muy activas en la inflamación crónica (Viljoen et al, 2012). En esta línea, también se ha descrito la acción anti-inflamatoria de algunos polifenoles, principalmente flavonoides, de inhibir la acción de las enzimas COX y LOX, implicadas en la liberación de citoquinas proinflamatorias, aumentadas por el estrés oxidativo (Fernández Urquiza et al, 2004; Bellik et al, 2012).

Por otro lado, en inflamación, las células del sistema inmune activadas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos), son susceptibles de modificar el perfil de ácidos grasos de sus membranas según el aporte de lípidos de la dieta. Durante el proceso inflamatorio, existen mediadores químicos (factores quimiotácticos y citoquinas) que influyen sobre las distintas etapas de la respuesta inflamatoria (marginación, rodamiento, adhesión y transmigración de leucocitos a través del endotelio), modulando tanto la expresión génica de moléculas de superficie, como la intensidad de la fijación a las células endoteliales. De este modo, la importancia de los lípidos en la inflamación radica en que el perfil lipídico de las membranas de las células inmunitarias va a condicionar la producción de estos mediadores químicos, determinando así la intensidad de la respuesta (Mesa García et al, 2006). Dentro de estos mediadores químicos, se destacan los eicosanoides, que son productos derivados de los AGPI, principalmente del ácido araquidónico (AA,  $\omega$ -6) y ácido eicosapentaenoico (EPA,  $\omega$ -3), y cuya formación va a depender de la composición de los fosfolípidos de las membranas leucocitarias, determinada por el perfil de ácidos grasos de la dieta ingerida (Chlopicki et al, 2003). Tanto el AA como el EPA son precursores de eicosanoides. Sin embargo, el AA es el principal AG que se incorpora en los fosfolípidos de membranas celulares, siendo así el precursor mayoritario de eicosanoides (Yaqoob et al, 2003). En este sentido, los ácidos grasos liberados de los fosfolípidos son transformados mediante las enzimas ciclooxigenasa (COX) y 5-lipoxigenasa (LOX) en prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. En relación al perfil lipídico de las células, se

ha reportado la actividad antiinflamatoria de flavonas, flavonoles y sus glicósidos extraídos de plantas, a través de la inhibición del metabolismo del AA y la disminución en la formación de prostaglandinas (Fernández Urquiza et al, 2004).

### ***Modulación de la apoptosis***

La apoptosis, o “muerte celular programada”, es una forma de muerte celular genéticamente definida, que tiene lugar de forma fisiológica durante la morfogénesis y la renovación tisular, y también en los procesos de regulación del sistema inmunitario. La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos en los seres vivos. Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido genético y evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis. Las células en proceso de apoptosis reducen su tamaño y fragmentan su contenido genético. De esta manera, pueden ser eficientemente englobadas vía fagocitosis y, consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente. La aparición de trastornos en la regulación de los genes responsables del proceso apoptótico puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades como tumores, enfermedades autoinmunes, o enfermedades neurodegenerativas (Granados et al, 2012).

Distintas estructuras de polifenoles ejercen efecto apoptótico celular (Delgado Ciruelo, 2015). De esta manera, distintas líneas celulares han demostrado que, por ejemplo, los flavonoides pueden inducir apoptosis en células cancerígenas y no así en células sanas. Algunos de los mecanismos mencionados en este proceso es la acción pro-oxidante de polifenoles en células tumorales, la alteración de la expresión de proteínas y la alteración de las rutas de señalización molecular (Fresco et al, 2010; Delgado Ciruelos, 2015).

Muchos polifenoles quimiopreventivos dietéticos, incluyendo quercetina, epigalocatequina, apigenina, ácido elálgico, y resveratrol, ejercen su efecto inhibitor sobre la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis (Fresco et al, 2010).

Por otra parte, los polifenoles ejercen diferentes efectos sobre el medio oxidativo de células cancerosas y normales, ya que podrían modificar el sistema redox de las células

cancerígenas, siendo más pronunciados los efectos citotóxicos de los cancerígenos en las células tumorales que en las células normales (Fresco et al, 2010).

### **1.3. Sistema Nervioso Central**

El sistema nervioso central (SNC) es una estructura biológica compleja de los animales. Está constituido por el encéfalo y la médula espinal, rodeados por tres membranas o meninges: duramadre (externa), aracnoides (intermedia) y piamadre (interna). Están protegidos por material óseo del cráneo y la columna vertebral, respectivamente. Las células que forman el SNC se disponen de tal manera que dan lugar a dos formaciones muy características: la sustancia gris, constituida por el soma de las neuronas y sus dendritas, además de fibras amielínicas; y la sustancia blanca, formada principalmente por las prolongaciones nerviosas mielinizadas (Eynard et al, 2016; Puelle López et al, 2008).

#### **Estructura encefálica**

Desde el punto de vista embrionario, la estructura del SNC es prosencéfalo o cerebro anterior (telencéfalo y diencéfalo), mesencéfalo o cerebro medio y rombencéfalo o cerebro posterior (protuberancia, cerebelo y bulbo raquídeo) además de la estructura de la médula espinal. Cada región cerebral se describe a continuación (Eynard et al, 2016; Puelle López et al, 2008):

- **Telencéfalo:** Representa el nivel más alto de integración somática y vegetativa, siendo la región más voluminosa del encéfalo. Presenta diferente grado de desarrollo en los distintos grupos de vertebrados. La parte externa de los hemisferios cerebrales, constituida por sustancia gris (cuerpos neuronales), se denomina corteza cerebral, la cual centraliza e interpreta las sensaciones, elabora las respuestas conscientes, controla los movimientos voluntarios y abarca la conciencia, la memoria y la inteligencia. La parte interna de los hemisferios cerebrales, constituida por sustancia blanca (axones mielínicos de las neuronas), conecta entre sí los dos hemisferios en una zona denominada cuerpo calloso.

- **Diencéfalo:** situado entre el telencéfalo y el mesencéfalo. Está constituido por hipotálamo (base del tálamo donde se localiza la hipófisis, controla funciones viscerales autónomas y constituye el centro del apetito, la sed y el sueño), subtálamo (contiene núcleo rojo y sustancia gris), tálamo (vía de entrada de estímulos sensoriales excepto el olfatorio, residen las emociones y los sentimientos), epitálamo (glándula pineal, núcleos habenuares y estrías medulares), metatálamo y el tercer ventrículo.
- **Mesencéfalo:** Está atravesado por un conducto estrecho, el acueducto de Silvio, por donde circula el líquido cefalorraquídeo desde el tercer hacia el cuarto ventrículo. Integrado por el tectum (techo) que se localiza en la porción dorsal del mesencéfalo, y el tegmentum (tegumento) que es la porción del mesencéfalo situada debajo del tectum. Conduce impulsos motores desde la corteza cerebral hasta el puente tronco-encefálico y conduce impulsos sensitivos desde la médula espinal hasta el tálamo. El mesencéfalo también se relaciona con algunos aspectos de la visión, la audición, el sueño y no vigilia.
- **Cerebelo:** es una región del encéfalo cuya función principal es de integrar las vías sensitivas y las vías motoras. Existe una gran cantidad de haces nerviosos que conectan el cerebelo con otras estructuras encefálicas y con la médula espinal. El cerebelo integra toda la información recibida para precisar y controlar las órdenes que la corteza cerebral envía al aparato locomotor a través de las vías motoras.
- **Protuberancia:** es el segmento más prominente del tronco del encéfalo. Contiene en su núcleo, una porción de la formación reticular, que contiene núcleos importantes para el sueño y la alerta. Tiene como función conectar el mesencéfalo y el bulbo raquídeo con estructuras superiores como los hemisferios del cerebro o el cerebelo. Se puede definir a la protuberancia anular como un órgano de conducción y un centro funcional.
- **Bulbo raquídeo:** es el más bajo de los tres segmentos del tronco del encéfalo, situándose entre el puente tronco encefálico o protuberancia anular, por arriba, y la médula espinal, por debajo. Sus funciones incluyen la transmisión de impulsos de

la médula espinal al encéfalo. También se controlan las funciones cardíacas, respiratorias, gastrointestinales y vasoconstrictoras (Eynard et al, 2016; Puelle López et al, 2008).

## **Glia**

Además de las neuronas constituyentes de las regiones anteriormente descritas, las células gliales o neuroglia son células del tejido nervioso, complementarias a las neuronas, que se comportan como células tróficas del SNC, fundamentales para el desarrollo normal de las neuronas y su comunicación, actuando como sustrato físico para el desarrollo tisular. Constituyen una matriz interneural en la que hay una gran variedad de células estrelladas y fusiformes que, si bien no forman contactos sinápticos, sus membranas contienen canales iónicos y receptores capaces de percibir cambios ambientales (Taleisnik, 2010). Liberan transmisores, aunque carecen de la capacidad para producir potenciales de acción. Su función principal es de soporte y regulación de las neuronas, la intervención activa en el procesamiento neural (gliotransmisión) y el control en el microambiente celular en lo que respecta al suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento (Purves, 2009). En el SNC, está formada por distintos tipos de células, siendo los astrocitos los principales y más numerosos, encargados de la liberación del factor de crecimiento. Los oligodendrocitos son otro tipo celular, más pequeños que los astrocitos, forman las vainas de mielina que envuelven los axones. La microglia segrega factores de crecimiento y se multiplican en daño encefálico, siendo células inmunes. Durante el proceso inflamatorio, se mueven hacia el área afectada, fagocitan bacterias y restos celulares, liberan compuestos químicos que destruyen bacterias y pueden causar daño neuronal (Taleisnik, 2010).

La glía tiene la función de mantener la homeostasis del tejido y contribuir a la neuropatofisiología del SNC y periférico (SNP). Además de proporcionar productos estructurales y metabólicos de apoyo a las neuronas, la glía también contribuye a la recuperación después de lesiones neuronales (Rasband et al, 2016). Así, cuando se produce un daño en el sistema nervioso, la glía reacciona cambiando su estado normal al de glía reactiva (Gómez Nicola et al, 2006). La reactividad glial actúa, inicialmente, reparando

daños y normalizando niveles de nutrientes y neurotransmisores; sin embargo, termina por generar lesiones secundarias que pueden llegar a cronificar la patología, provocando muerte neuronal secundaria (Gómez Nicola et al, 2006).

### **Barrera hematoencefálica**

La BHE puede definirse como una propiedad funcional de los vasos sanguíneos del SNC, por la que se impide el intercambio libre de iones y moléculas orgánicas entre el plasma sanguíneo y el tejido nervioso (Pascual-Garvi et al, 2004). Se encuentra constituida por células endoteliales especializadas que recubren el sistema vascular cerebral, manteniendo la homeostasis de neuronas y células gliales. La propiedad de BHE se basa en la existencia de una permeabilidad muy restringida del endotelio vascular del SNC al paso de solutos plasmáticos y bloqueo de acceso de sustancias tóxicas tanto endógenas como exógenas, mientras que facilita el paso de agua, nutrientes, gases como el oxígeno y el CO<sub>2</sub> y moléculas liposolubles pequeñas (400-600 Da de peso molecular) (Pascual-Garvi et al, 2004; Pardridge, 2002).

Diversos estudios han demostrado la capacidad de los compuestos fenólicos de atravesar la BHE y alojarse en distintas regiones cerebrales (Andrade et al, 2012; Figueira et al, 2017). Sin embargo, el acceso de estos compuestos al SNC es un tema de debate, dado que los capilares cerebrales están especializados para formar la BHE y, para tener acceso, los polifenoles deben ser altamente liposoluble o sujeto a captación por procesos de transporte activo (Scheepens et al, 2010). Las bombas de eflujo presentes en la BHE son otro obstáculo para la penetración de algunos tipos de polifenoles en el cerebro, como las catequinas (Zini et al, 2006; Scheepens et al, 2010). Los estudios realizados *in vitro* indican que algunos flavonoides o sus metabolitos cruzan la BHE y que el potencial de permeación es consistente con la lipofilia del compuesto (Andrade et al, 2012). Más recientemente, en un modelo humano de BHE utilizando células endoteliales (hCMED/D3) se demostró que tanto la catequina como la epicatequina podían cruzar estas células de manera dependiente del tiempo de suministro (Andrade et al, 2012).

#### **1.4. Cáncer**

El estrés oxidativo es un factor muy importante en la progresión de la carcinogénesis asociada a la inflamación. En este sentido, las células inflamatorias producen, en su metabolismo, radicales libres de oxígeno y de nitrógeno que dañan a los ácidos nucleicos y a las proteínas, induciendo la peroxidación lipídica de la porción hidrofóbica de la membrana celular y generando hidroperóxidos cíclicos altamente tóxicos, que causan graves perturbaciones en la membrana celular e incluso mutaciones en el ADN. Entre los factores celulares que relacionan un proceso inflamatorio y el cáncer, se destacan las plaquetas. Éstas juegan un papel fundamental en la inflamación por su comunicación con leucocitos y células endoteliales, permitiendo el reclutamiento de leucocitos en diferentes tejidos y cambios fenotípicos en las células estromales, lo cual contribuye al desarrollo de enfermedades como el cáncer (Dovizio et al, 2014). Estos factores pueden causar un proceso inflamatorio y un fenotipo canceroso en otras células a través de una inducción persistente de COX-2 y una alta producción, fundamentalmente, de prostaglandinas (Alcaide Molina, 2015).

Entre los factores moleculares que relacionan los procesos inflamatorios y el cáncer se destacan las evidencias relacionadas con el NFκB como regulador de genes pro-inflamatorios, y, por su papel en relación al crecimiento no controlado, inhibición de la apoptosis, metástasis y angiogénesis (Sarkar et al, 2008; Al-Halabi et al, 2011). Las estrategias farmacológicas actuales para su regulación se dirigen hacia el control de los mecanismos que producen su activación persistente, como ocurre en patologías inflamatorias crónicas (Tan et al, 2013). Otra vía relacionada es la del factor peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPARγ), que está siendo explorada actualmente, ya que se ha comprobado su importante papel en la progresión del cáncer inhibiendo la proliferación celular exagerada presente en un tumor y su invasión a los tejidos adyacentes, además de su control en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Fumery et al, 2017).

#### **Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte en humanos (Instituto Nacional del Cáncer, 2014) y uno de los más frecuentes, ocupando el cuarto lugar en

Argentina si se tiene en cuenta su incidencia (9,8%) y siendo el proceso neoplásico maligno con mayor tasa de mortalidad (Instituto Nacional del Cáncer, 2014). Sus principales complicaciones pueden presentarse en forma directa a través de procesos metastásicos (Instituto Nacional del Cáncer, 2014), siendo el cerebro una de las localizaciones de estos tumores secundarios (Popper, 2016), o de forma indirecta induciendo un estado neuroinflamatorio debido a síndromes paraneoplásicos (Ekiz et al, 2013; Koike et al, 2013; Erro et al, 2004; Jurado Gámez et al, 2001). A nivel neurológico, este síndrome puede afectar una parte del sistema nervioso en forma aislada o en forma generalizada (Erro et al, 2004; Jurado Gámez et al, 2001). Suele ser el primer síntoma (Heinemann et al, 2008; Jurado Gámez et al, 2001) y el que desencadena el deterioro progresivo e irreversible en las personas que presentan adenocarcinomas de pulmón (Jurado Gámez et al, 2001). Su patogenia se explica por mecanismos inmunológicos y se caracterizan por la presencia de altas concentraciones de mediadores en suero y en líquido cefalorraquídeo (Erro et al, 2004). Además, este síndrome puede inducir una desmielinización grave con el consiguiente deterioro neurológico (Heinemann et al, 2008).

En este sentido, el consumo de determinados alimentos de origen vegetal, fuente de polifenoles, presentan posibles efectos protectores en el desarrollo y evolución de esta patología. De acuerdo a esto y dado el reconocido efecto neuroprotector de los polifenoles, distintos extractos vegetales han sido asociados con un bajo riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer y, contrarrestar sus efectos secundarios. Todo esto se encuentra avalado por la capacidad de determinados fenoles de atravesar la barrera hematoencefálica y depositarse en regiones cerebrales, ejerciendo un efecto quimiopreventivo (Latruffe et al, 2013; Ramirez-Mares et al, 2004). Sin embargo, la evidencia científica no es concluyente en relación a la cantidad ingerida o tipo de polifenoles necesarios para dicha acción quimiopreventiva.

### **1.5. Efecto neuroprotector de polifenoles**

La neuroinflamación y neurodegeneración están presentes en patologías crónicas como cáncer y enfermedades asociadas a la edad (Jurado Gámez et al, 2002; Vauzour, 2010 y



2012). Es impulsada por células gliales residentes activadas (astrocitos y microglia) que resultan en la invasión de las células inmunes circulantes y la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  e IL-6), óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 y ROS (Vauzour, 2010 y 2012). Entre los numerosos factores liberados por las células gliales activadas, se ha informado que la producción excesiva de NO induce la muerte celular neuronal (apoptosis) al dañar la función de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en las neuronas (Levites et al, 2001). También se ha sugerido que la activación, un evento importante en la neurotoxicidad inducida por microglia inducida, media tanto la producción de SO como la liberación de moléculas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ . Esta inflamación, en etapas tempranas, resulta protectora para el organismo. Sin embargo, la producción de citoquinas gliales también puede jugar un papel perjudicial en las enfermedades neuropatológicas activando las vías apoptóticas, por ejemplo, a través de la unión del TNF- $\alpha$  al receptor-1 del TNF- $\alpha$ , que produce la apoptosis neuronal (Vauzour, 2012).

Como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos tienen la capacidad de atravesar la BHE, alojarse en regiones cerebrales y, de esta manera, pueden regular distintas vías oxidativas y pro-inflamatorias. En estos procesos radica el efecto neuroprotector de los polifenoles ingeridos con la dieta (Vauzour, 2012).

## 1.6. Hipótesis y Objetivos

### Hipótesis

Dado los efectos neuroprotectores de los compuestos fenólicos reportados en la bibliografía, se propone que la ingesta de fitoquímicos, provistos por infusiones, tendría un efecto protector en el encéfalo, atenuando estados oxidativos e inflamatorios deletéreos, tales como aquellos presentes en el síndrome paraneoplásico secundario a cáncer de pulmón.

### Objetivos

A partir de lo planteado hasta aquí, el objetivo general fue determinar el efecto del consumo de extractos vegetales acuosos derivados de plantas nativas argentinas sobre el sistema nervioso central de ratones, en función de su actividad redox y potencial inmunomodulador. En consecuencia, los objetivos específicos fueron:

1. Caracterizar los compuestos fenólicos de extractos acuosos de especies vegetales autóctonas.
2. Ensayar *in vitro* diversas concentraciones de los fitoextractos seleccionados en líneas celulares derivadas de tejido nervioso para determinar su bioactividad.
3. Ensayar *in vivo* la actividad redox de los fitoextractos seleccionados en ratones sanos.
4. Ensayar *in vivo* la capacidad neuroprotectora e inmunomoduladora del fitoextracto con mejor potencial en un modelo murino oncológico.
5. Evaluar biodisponibilidad de compuestos fenólicos post consumo de fitoextracto en diferentes regiones encefálicas de un modelo oncológico murino.

## Capítulo 2 . MATERIALES Y MÉTODOS

### 2. Materiales y equipamiento

**Materiales:** los reactivos, compuestos químicos, enzimas y kits comerciales utilizados se detallan en cada técnica desarrollada.

**Equipamiento e infraestructura:** los ensayos y determinaciones químicas se desarrollaron en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), unidad ejecutora de doble dependencia CONICET-UNC, que posee la infraestructura necesaria, incluyendo instalaciones amplias con servicios generales, soporte técnico, instalación central de agua deionizada, cámara frigorífica, bioterio y laboratorio de cultivo celular. Cuenta con laboratorios de biología celular y molecular con los insumos e instrumental general (material de vidrio, baños termostatzados, centrífugas, pHmetros, balanzas analíticas, heladeras, freezers, etc.). Dispone de equipos de diferente complejidad para análisis, procesamiento y conservación de muestras: cromatógrafo líquido-gas Clarus 500© (Perkin-Elmer®), multilector de microplacas GloMax® Multi (Promega Corp., EE.UU.) para determinar luz visible, UV, fluorescencia y luminiscencia, microscopio electrónico y videomicroscopio Leica (Alemania) para detectar luz visible e invertida y fluorescencia, liofilizador (Thermovac®), freezer -80°C (Thermo Scientific®), etc.

Los análisis de fitoextractos por HPLC se realizaron en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca (Salamanca, España) donde se trabajó con un cromatógrafo líquido de la serie Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con detección por UV-Vis por diodos (DAD) y ligado a espectrómetro de masas (MS) API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) con una columna Spherisorb® S3 ODS-2 C18 de fase reversa, 3 µm, 150 × 4,6 mm (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.).

Por otro lado, los análisis de los tejidos murinos por HPLC se llevaron a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC, Madrid, España) donde se utilizó un cromatógrafo líquido de la serie Hewlett-Packard 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con detección por UV-Vis por diodos (DAD), con bomba cuaternaria y una columna Ultrabase C18 (5 µm, 4,6 mm x 150 mm).

Las técnicas, determinaciones y resultados se desarrollaron en respuesta a cada uno de los objetivos propuestos.

## **2.1. Caracterización analítica de extractos**

### **Obtención y preparación**

Con el consentimiento del gobierno de Córdoba (MENCYT, Córdoba, Argentina), se recolectaron muestras de *Lantana grisebachii* Stuck. (Verbenaceae) (LG, n≥3) y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltl. (Apocynaceae) (AQB, n≥3) en la zona montañosa de la región fitogeográfica chaqueña argentina, durante los meses de verano (coordenadas de GPS: -31,28, -64,44). Las plantas fueron identificadas y almacenadas en el Herbario RIOC (Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina). Por otro lado, se obtuvieron muestras de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) (IP, n≥3) de producción agroecológica (Jactancia, Argentina) en la región del Paraná (noreste argentino). De cada planta, se extrajo un gramo (1 g) pulverizado secado al aire (hojas y tallos) y se adicionaron 10 mL de agua a 83°C. Estas infusiones (té) se enfriaron a temperatura ambiente durante una hora, alcanzando una temperatura final de 35-40°C (en la oscuridad, con agitación constante). Los extractos de las infusiones se recuperaron con filtros estériles de poliéster sulfona 0,2 µm de poro para 4,5 bar (MS®) y luego se liofilizaron obteniéndose 0,259 g del extracto de LG/mL de infusión, 0,194 g del extracto de AQB/mL de infusión y 0,497 g del extracto de IP/mL de infusión.

### **Análisis por HPLC-DAD-MS de fitoextractos**

La composición fenólica de los extractos de plantas estudiados (LG, AQB, IP) se analizó por cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography* -HPLC-) acoplada a detección de diodos (DAD) y espectrofotometría de masa (MS).

Se empleó una solución acuosa (0,1%) de ácido fórmico (Sigma-Aldrich EE.UU.) (A) y acetonitrilo 100% de calidad HPLC (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (B), estableciendo distintos gradientes para realizar las corridas de las muestras. Los espectros se registraron de 220 a 600 nm y la detección se llevó a cabo a 250, 280, 330 y 370 nm como longitudes de onda

seleccionadas. El espectrómetro de masas se conectó al sistema de HPLC a través de la salida de DAD. La espectrometría de masas se llevó a cabo utilizando el espectrómetro equipado con una fuente de ESI y un analizador de masas de trampa de iones lineal de triple cuadrupolo controlado por el software Analyst 5.1. La espectrometría de masas se realizó en modo negativo según la metodología utilizada para el análisis de flavonoles y ácidos fenólicos (García-Estévez et al, 2010). Para determinar los compuestos más polares en AQB, su extracto también se analizó con el método cromatográfico utilizado por García-Estévez et al. para el análisis de los elagitaninos (García-Estévez et al, 2012) y el correspondiente método de MS para el análisis de masas completo (García-Estévez et al, 2012). El análisis se llevó a cabo en colaboración con la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, España.

### **Identificación y cuantificación fenólica**

Para la caracterización fitoquímica de cada planta, se resuspendieron los extractos liofilizados alcanzando concentraciones de 1 mg/mL de extracto seco de LG e IP y 1,5 mg/mL de extracto seco de AQB, ya que pruebas cromatográficas previas indicaron la existencia de compuestos fenólicos en bajas concentraciones en este último.

Los compuestos se identificaron por sus tiempos de retención, espectros UV, iones moleculares y fragmentos suministrados por el análisis de MS. Las diferencias en la abundancia relativa de los fragmentos de iones detectados para cada compuesto se utilizaron para diferenciar entre isómeros en comparación con los patrones de fragmentación reportados en la literatura (Clifford et al, 2007; Sousa et al, 2015). Cada compuesto identificado se cuantificó en función de su estructura molecular.

Los estándares utilizados para identificar y cuantificar los compuestos fueron: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido vainílico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido geniposídico, epicatequina, catequina, quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-rutinósido, isorhamnetina 3-O-glucósido, isorhamnetina 3-O-rutinósido, kaempferol 3-O-glucósido (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

## **2.2. Ensayo *in vitro***

Se utilizaron dos líneas celulares derivadas del tejido nervioso (ensayo *in vitro*), las células T98-G de glioblastoma multiforme humanas (ATCC® n°CRL-1690™) y células C6 de glioma de rata (ATCC® n°CCL-107™) para determinar la bioactividad de los extractos analizados en relación a un grupo control que no fue expuesto a los extractos.

Las líneas celulares mencionadas se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (10%), penicilina G de sodio (100 UI/mL) y sulfato de gentamicina (40 mg/mL), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se obtuvieron subcultivos de ambas líneas celulares por tratamiento suave con tripsina (0,25%).

### **Tratamiento de líneas celulares**

Las células cultivadas se sembraron en placas de 96 pocillos de poliestireno (Jet Biofil®, Argentina) de fondo plano estériles (50000 células/cm<sup>2</sup>) y se incubaron durante 24 horas para lograr la máxima adhesión. Luego se trataron durante 72 horas con extracto de LG, AQB o IP en intervalo de dosis: 0 (control), 50, 100, 200 µg de extracto/mL de DMEM.

### **Viabilidad celular**

La viabilidad celular se determinó para conocer la cantidad de células viables luego de ser sometidas a los tratamientos con las distintas dosis de fitoextractos. Este parámetro se midió y confirmó mediante la prueba colorimétrica de resazurina. Transcurridas las 72 horas de tratamiento, se extrajo el medio de cultivo (que se conservó para otras determinaciones) y se lavaron los pozos de células con buffer fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS) a pH 7. Se agregó DMEM con resazurina (0,05 mg/mL de DMEM), durante 6 horas en condiciones estándares. Cumplido el tiempo de incubación, se leyeron las placas a una longitud de onda de excitación 600 nm (lector de microplacas GloMax-Multi, Promega Corp., EE. UU.) (Soria et al, 2014). Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad (%) con respecto al grupo control.

### **Determinación de Interleuquina 6 (IL-6) en sobrenadante de células**

Los sobrenadantes de cultivo de las células tratadas con fitoextractos fueron conservados para determinar la liberación de IL-6. Ésta se determinó por espectrofotometría mediante ELISA con un kit OptEIA™ (BD Biosciences, EE. UU.) siguiendo el protocolo determinado por el fabricante. Los resultados se calcularon a partir de una curva estándar de IL-6 (pg/mL), se determinaron por mL de sobrenadante y se expresaron en porcentaje de liberación de IL-6 (%) con respecto al grupo control.

### **Perfil de ácidos grasos de células tratadas**

Los ácidos grasos (AG) fueron analizados por cromatografía de gases, para lo cual los lípidos totales de las células tratadas se extrajeron y dividieron por el método de Folch (Folch et al, 1957). La fase que contiene fosfolípidos se trató con metóxido de sodio a 4°C durante 24 horas para obtener ésteres metílicos de ácidos grasos, que se extrajeron y secaron con nitrógeno (Comba et al, 2010). La separación, cuantificación e identificación de los ésteres se realizaron utilizando una columna capilar (BPX 20 m de longitud, 0,25 mm DI, 0,25 µm de película, SUPELCO®, EE. UU.) en un cromatógrafo Clarus 500 (Perkin-Elmer®) con un detector de ionización de llama (Comba et al, 2010).

Los estándares empleados (Nu-chek®, EE.UU.) para la identificación y cuantificación de AG permitió luego agruparlos en familias para su análisis:

-AG saturados: mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), lignocérico (24:0);

-AG ω3: α-linoleico (18:3), eicosatrienoico (20:3), eicosapentaenoico (20:5), docosapentaenoico (22:5), docosahexaenoico (22:6);

-AG ω6: linoleico (18:2), γ-linoleico (18:3), eicosadienoico (20:2), araquidónico (20:4);

-AG ω7: palmitoleico (16:1);

-AG ω9: oleico (18:1), eicosanoico (20:1), erúcico (22:1), nervónico (24:1).

Los resultados se expresaron en porcentaje (%) con respecto al total de ácidos grasos determinados.

### **Análisis estadístico multivariado**

Las dosis de extractos y las respuestas celulares se analizaron mediante regresión lineal en ambas líneas celulares. La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) se utilizó para discriminar los efectos de los compuestos fenólicos aportados por cada extracto y las variables respuesta, modelando las dosis de tratamientos (0, 50, 100 y 200 µg de extracto/mL de DMEM) como predictores, determinando como variables respuesta a la viabilidad celular, los AG y la liberación de IL-6, y tomando a las líneas celulares C6 y T98 como datos categóricos. Este es un método estadístico multivariado que fue calculado con el software Infostat v.2012 para generalizar y combinar el análisis de componentes principales y el análisis de regresión lineal. Se utilizó para predecir un conjunto de variables dependientes de un conjunto de predictores, informando correlaciones estandarizadas representadas por gráficos lineales triplot.

### **2.3. Diseños experimentales *in vivo***

#### **Animales de experimentación**

Los ensayos y procedimientos con animales se realizaron en resguardo de las normas éticas vigentes para el manejo de animales experimentales (86/609/CEE) y sujetos al protocolo de trabajo evaluado y aprobado por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (año 2013) (Anexo 1).

Los ensayos se realizaron con ratones Balb/c, de ambos sexos, endocriados, de aproximadamente 60 días de edad (2 meses, peso: 25-35 g). Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándares de bioterio (IBC, FCM-UNC) apropiado para mantenimiento de animales. Se mantuvieron en jaulas de polipropileno o metacrilato de dimensión 50x30x12 cm (Panlab®, Buenos Aires), con viruta de madera como material de nidificación (Equidiet®, Argentina). Permanecieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 hs (luz de 8:00 a 20:00 horas), en condiciones ambientales controladas (temperatura: 22°C; humedad: 40-50%). Recibieron agua ad libitum (150±10 mL/Kg/día; Aguas Cordobesas SA, Argentina) y una dieta comercial ad libitum (200±13 g/Kg/día; Cargill SACI, Argentina).



Para realizar los objetivos restantes se desarrollaron los siguientes diseños experimentales y se llevaron a cabo las determinaciones detalladas a continuación:

#### **Ratones sanos expuestos a fitoextractos**

El primer ensayo (ensayo 1) se diseñó con ratones sanos de ambos sexos, mantenidos bajo las condiciones estándares mencionadas. Los animales fueron separados aleatoriamente, respetando la proporción de sexos, en cuatro grupos experimentales ( $n \geq 3$  por grupo y sexo) y fueron tratados por vía oral durante 30 días con las infusiones de LG, AQB o IP con 100 mg/Kg/día de cada extracto además de un grupo control (C) que recibió agua (Figura 4). Luego de la autopsia, se retiró el encéfalo y se lo seccionó en: cerebro (telencéfalo y diencéfalo), mesencéfalo, cerebelo y tallo encefálico. Cada región fue pesada, homogeneizada con PBS y preservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar las determinaciones bioquímicas (Figura 4).

#### **Modelo murino de cáncer de pulmón**

Dados los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* anteriores, se diseñó un modelo experimental con ratones machos Balb/c, endocriados, de dos meses de edad, mantenidos bajo las mismas condiciones estándares mencionadas anteriormente, que fueron inoculados (inoculación subcutánea) con las células LAC-1 de adenocarcinoma pulmonar ( $1,4 \times 10^6$  células/animal), y desarrollaron un tumor de alta malignidad con síndrome paraneoplásico, caquexia y alto compromiso sistémico (Piegari et al, 2011). Bajo este protocolo se llevó a cabo el segundo ensayo (ensayo 2), donde ratones machos, inoculados fueron divididos en tres (3) grupos experimentales ( $n \geq 3$ ) tratados diariamente por vía oral con infusión de *Ilex paraguariensis* (IP) en dos dosis: 50 o 100 mg/Kg/día de extracto de IP disuelto en agua (volumen constante suministrado con pipeta automática de precisión) y un grupo control (C) que recibió agua (Figura 4). El tratamiento comenzó el día del inóculo y se mantuvo durante 21 días dado el crecimiento tumoral ( $\leq 10\%$  en proporción al peso del ratón). Luego de la autopsia, se extrajeron sangre por punción cardíaca, se retiró

el encéfalo y se extrajo cerebro (telencéfalo y diencéfalo), hígado y tumor (para las determinaciones bioquímicas de biodisponibilidad de compuestos fenólicos). Cada tejido fue pesado, homogeneizado con agua ultrapura (miliQ) y preservado a -80°C para las determinaciones. Una fracción de telencéfalo se fijó en formaldehído al 10% para el análisis histopatológico (Figura 4).

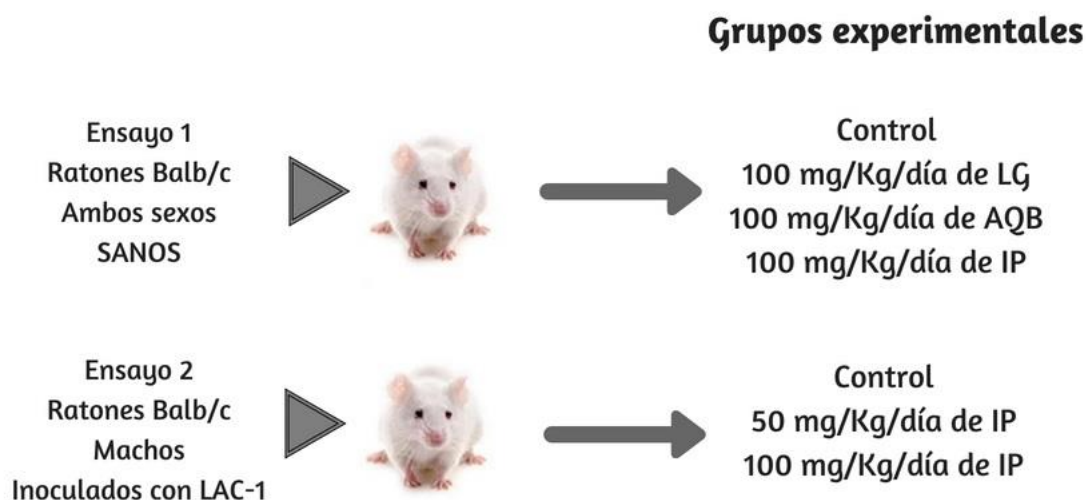


Figura 4. Esquema de diseños experimentales con ratones Balb/c. LG: *Lantana grisebachii*; AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*; IP: *Ilex paraguariensis*.

#### 2.4. Determinaciones bioquímicas

Compuestos y reactivos: el reactivo de Folin, el reactivo naranja de xilenol, el Kit comercial de la enzima  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa -GGT- (GT Laboratorios, Santa Fe, Argentina) y otros reactivos mencionados se obtuvieron de Sigma Aldrich Inc. (EE.UU.). Los solventes fueron de Cicarelli S.A (Argentina). Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un lector multiplaca GloMax® (Promega Corp., EE. UU.).

La determinación de proteínas totales se realizó utilizando un kit comercial de proteínas totales (GT Laboratorios, Santa Fe, Argentina) y se expresaron en mg de proteínas totales por mL de muestra (mg/mL).

#### Concentración de fenoles totales (FT)

-Obtención de sobrenadante: 1 mL de homogenato se trató con metanol y ácido tricloroacético (a concentración final de 60% y 2,5%, respectivamente) durante 30 minutos a 50°C para luego obtener el sobrenadante por centrifugación.

-Determinación de fenoles totales (FT): se midieron en el sobrenadante (25 µL) incubado con el reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (25 µL) (Sigma Aldrich, EE.UU.), agua destilada (150 µL) y una solución saturada de bicarbonato de sodio (50 µL), a 37°C durante 30 min en oscuridad. Los resultados se obtuvieron midiendo absorbancia a 750 nm y calculando la concentración por mg de proteínas o g de tejido a partir de una curva estándar de ácido gálico (5-160 µg/mL).

### **Anión superóxido**

El anión superóxido (SO) se evaluó por espectrofotometría en homogenato de tejido encefálico murino mediante tinción con nitroazul de tetrazolio (1 mg/mL). Las muestras se mezclaron con el colorante (9:1 v/v), y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37°C. Luego, esta mezcla se añadió con dimetilsulfóxido e hidróxido de potasio 2M (2:1:1 v/v/v) antes de leer a 600 nm. La absorbancia de SO se dividió por contenido de proteína y luego se expresó como porcentaje respecto del control (%).

### **Peróxidos**

Los peróxidos acuosos y lipídicos (PA y PL, respectivamente) se analizaron por colorimetría en homogenatos de tejido encefálico murino. Las muestras se mezclaron con un reactivo a base de xilenol color naranja (1:10 v/v) y se incubaron durante 30 minutos (Cittadini et al, 2015). Luego, las concentraciones de peróxidos se estandarizaron por el contenido de proteína y se expresaron como porcentajes de absorbancia (560 nm) respecto al control (%).

### **Actividad específica de enzima $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT)**

La actividad específica de enzima GGT (Sigma, GGT, EC 2.3.2.2) se midió en homogenatos de tejido encefálico murino utilizando el método cinético de Szasz, dado su papel en el metabolismo del glutatión. Las muestras se mezclaron con los reactivos del kit (pH 8,25; 100

mmol/L de Tris), tampón (2,9 mM de L- $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida y 100 mM de glicilglicina) a 25°C. Las unidades catalíticas internacionales se calcularon multiplicando 1158 veces (una constante) y la diferencia de absorbancia/min y dividiendo por contenido de proteína (mUI/mg). La actividad de GGT se expresó como positiva o negativa (utilizando criterios técnicos de precisión como punto de corte) en condiciones de velocidad inicial y rangos de linealidad.

### **Perfil de ácidos grasos**

Los lípidos y sus derivados poseen un rol modulador sobre el estado oxidativo de los tejidos y la respuesta inflamatoria de éstos, así como en las respuestas celulares mediadas por receptores de membrana, por lo que se estableció el perfil cromatográfico de ácidos grasos en los tejidos expuestos a los diferentes tratamientos.

Los AG de los homogenatos fueron analizados por cromatografía de gases, con el mismo protocolo empleado en las líneas celulares estudiadas (ver sección 2.2).

### **Determinación de Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ )**

Dado que el compromiso del SNC secundario a cáncer puede involucrar una respuesta inflamatoria, con los homogenatos tisulares obtenidos de los ensayos oncológicos se llevó a cabo la medición de marcadores neuroinflamatorios.

Los niveles de TNF $\alpha$  en cerebro se determinaron por espectrofotometría mediante ELISA con un Kit OptEIA™ (BD Biosciences, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante con una absorbancia determinada a 450 nm. Los resultados se calcularon a partir de una curva estándar de TNF $\alpha$  (pg/mL) y se expresaron como pg de TNF $\alpha$  por gramo de tejido (pg TNF $\alpha$ /g de tejido).

### **Determinación de Interleucina 6 (IL-6)**

Los niveles de IL-6 en sangre y cerebro se determinaron por espectrofotometría mediante ELISA con un kit OptEIA™ (BD Biosciences, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante con una absorbancia determinada a 450 nm. Los resultados se calcularon a partir de una

curva estándar de IL6 (pg/mL) y se expresaron como pg de IL6 por g de tejido (pg IL6/g de tejido) y mL de sangre (pg IL6/mL de sangre).

### **Estudios histológicos**

Después de la extracción del tejido encefálico, se fijó una porción de telencéfalo con formol al 10% y se incluyó en parafina. Se realizaron cortes de 7  $\mu$ m de espesor ( $n \geq 6$ ) y se procesaron tres portaobjetos con cada tratamiento y grupo control para los siguientes estudios:

#### **Densidad Celular**

Los cortes obtenidos se desparafinaron en xilol (2 baños de 15 minutos cada uno), se escurrieron y se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcoholes hasta agua destilada (3 minutos por cada concentración) para ser teñidos con *hematoxilina-eosina (H-E)*. Se utilizó Hematoxilina Activada (Biopur®) durante 2 minutos. Se viraron con agua corriente durante 5 minutos. Se colorearon con Eosina acidificada (Biopur®) durante 1 minuto y se deshidrataron en serie de alcohol creciente. Por último, se aclararon en xilol y se montaron en bálamo. Estas secciones se analizaron utilizando fotomicrografías obtenidas en un video-microscopio óptico Leica a 400x y las imágenes se analizaron con programa ImageJ 1.48 (EE.UU.). Con este software, se estudió la densidad celular en porcentaje (%) de área total y se expresó en porcentaje (%) con respecto al grupo control.

#### **Nivel de mielina**

Los cortes obtenidos se tiñeron con la técnica de Klüver Barrera para estudiar mielinización. Se desparafinaron en xilol (dos baños de 15 minutos) y se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada (3 minutos por cada concentración). Se incubaron con solución de *luxol fast blue* (ab150675, ABCAM) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua destilada y se diferenciaron en carbonato de litio durante 20 segundos. Luego se sumergieron en alcohol (vol 70) y se enjuagaron en agua destilada. A continuación, se enjuagaron durante 5 minutos con *violeta de cresilo* y se lavaron rápidamente en agua destilada. Por último, se deshidrataron en 3 pasajes de alcohol

absoluto, se aclararon y montaron con bálsamo. Con esta técnica se observa la mielina y los fosfolípidos teñidos de azul a verde y las neuronas de violeta. Los cortes se analizaron con video-microscopio óptico Leica a 400x y las imágenes se analizaron con el programa ImageJ 1.48 (EE.UU.). Se analizó la sustancia blanca de cada preparación y se determinó el porcentaje (%) de área donde faltaban las vainas de mielina (pérdida de mielina) y se expresó el porcentaje (%) con respecto al grupo control.

### **Apoptosis**

Los cortes fueron teñidos con colorante de *Hoechst* (33342, ThermoFisher®) para determinar la morfología nuclear de células apoptóticas. Después de rehidratar los cortes con concentraciones decrecientes de etanol: agua (50:50), se realizó la tinción de Hoechst diluida en PBS (1 mL de PBS + 0,5 mL de Hoechst). Se incubó durante 10 minutos a 37°C en la oscuridad. Después de tres lavados con PBS, se tiñó con Eosina (1 mL de PBS + 50  $\mu$ L de eosina) y se dejó incubar nuevamente durante 5 minutos a 37°C en la oscuridad. Se repitió el lavado con PBS. El porcentaje (%) de células apoptóticas se estudió con un video-microscopio Leica con epifluorescencia (E: 350 nm/Em: 460 nm) a 400x. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ 1.48 (EE.UU.). La cantidad de células apoptóticas se expresó en porcentaje (%) con respecto al grupo control.

### **2.5. Análisis de compuestos fenólicos por HPLC en tejido nervioso**

Se analizaron los homogenatos de cerebro fraccionado en telencéfalo y diencefalo de los ratones inoculados con LAC-1 tratados con IP y el grupo control (ensayo 2, ver sección 2.5). El análisis se realizó por HPLC-UV en colaboración con el Instituto de Ciencia y Tecnología de los alimentos y la Nutrición (ICTAN)-CSIC, Madrid, España.

### **Preparación de muestras**

Las muestras liofilizadas de telencéfalo y diencefalo se resuspendieron en PBS y se procesaron con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa (EC 3.2.1.31) (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid, España). A alícuotas de 200  $\mu$ L de homogenato se le añadió ácido acético (0,58 N, 20  $\mu$ L) para evitar su degradación, seguido por la hidrólisis con enzima  $\beta$ -

glucuronidasa/sulfatasa. A continuación, las muestras se centrifugaron (4500 rpm, durante 10 min) y los solventes se evaporaron usando un concentrador SpeedVac a temperatura ambiente (30 min). Finalmente, las muestras se reconstituyeron con 0,20 mL de etanol: etanol (1:1, v/v), se mezclaron en un vórtex, se pasaron a través de un filtro MPVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  (difluoruro de polivinilideno) y se analizaron por HPLC-UV.

### **Análisis HPLC-UV**

Los sobrenadantes (20  $\mu\text{L}$ ) obtenidos se analizaron usando un cromatógrafo Agilent serie 1200 con una bomba cuaternaria, con detección por UV-Vis y una columna Ultrabase C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 150 mm) que se estableció termostáticamente a 25°C. Los disolventes utilizados para el análisis fueron ácido fórmico al 0,1% (A); Acetonitrilo de grado HPLC con 0,1% de ácido fórmico (B); agua ultrapura miliQ (C) y acetonitrilo (D) a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Los espectros se registraron en el modo de iones negativos (Hidalgo et al 2012).

### **Identificación y cuantificación fenólica**

Los compuestos fenólicos utilizados como estándar se analizaron en diferentes espectros UV: 260, 280, 306 y 320 nm y su tiempo de retención ( $t_R$ ) por HPLC.

La cuantificación de estos compuestos puros se realizó a distintas longitudes de onda: ácido ferúlico, cumárico y cafeico a 320 nm, mientras que el ácido gálico y clorogénico a 280 nm. También se determinó la quercetina a 320 nm.

Estos datos, tanto tiempo de retención como espectro UV, se utilizaron para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos y sus metabolitos presentes en los tejidos.

### **2.6. Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de tres experimentos separados realizados en triplicado. Para su análisis, se ajustaron los correspondientes modelos de ANOVA, seguidos por la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando el programa estadístico InfoStat 2012.

## Capítulo 3 RESULTADOS

### 3. Análisis fitoquímicos de los fitoextractos

#### Fitoquímica

Los resultados de la composición fenólica analizada por HPLC-DAD-MS se presentan en mg/g de planta (texto) y en mg/g de extracto seco (Tablas 2, 3 y 4). En las tablas se pueden observar características cromatográficas, tiempo de retención (tR), datos espectrales de masas, espectro UV ( $\lambda_{max}$ ), identificación tentativa y concentración de compuestos fenólicos.

#### - *Lantana Grisebachii*

En la tabla 2 se muestra el perfil fenólico de LG. Se identificaron 21 compuestos fenólicos (Figura 5) donde los iridoides glucósidos alcanzaron el 50% de los compuestos fenólicos totales (compuestos 2, 5, 7-8, 11, 13, 20-21). El compuesto 7 (tevesido) fue el más abundante en esta planta, alcanzando 10,4 mg/g. Se identificaron como iridoides, teniendo en cuenta sus espectros UV y los resultados del análisis de masas, que mostró un ion pseudomolecular a m/z 389 con un patrón de fragmentación y un pico significativo en m/z 345. El compuesto 2 alcanzó los 6,93 mg/g de planta y se identificó como dihidrotevesido con ion pseudomolecular en m/z 391. El tercer compuesto más abundante fue teveridosido (compuesto 8) alcanzando los 4,01 mg/g de planta, que mostró un ion [M-H]<sup>-</sup> m/z 403. Estos iridoides glucósidos exhibieron espectros UV con un máximo ( $\lambda_{max}$ ) a ~ 234-236 nm.

El compuesto 5 se identificó como ácido geniposídico, que se encontró en una cantidad menor a 0,45 mg/g de planta. En base a las características espectrométricas de masa, los compuestos 11 y 13, mostraron iones moleculares a m/z 537 y m/z 567 respectivamente, y fueron identificados como derivados geniposídicos. El compuesto 11 mostró un patrón de fragmentación con picos principales en m/z 163 ([ácido cumárico-H]) y 373 ([ácido geniposídico-H]<sup>-</sup>), identificándose como ácido cumaroil-geniposídico (0,96 mg/g de planta). Del mismo modo, el compuesto 13 mostró fragmentos iónicos importantes en m/z 193 ([ácido ferúlico-H]<sup>-</sup>) y m/z 373 ([ácido geniposídico-H]<sup>-</sup>), identificando así este compuesto



como ácido feruloil-geniposídico (1,19 mg/g de planta). Los compuestos 20 (tR 28,42 min, ion pseudomolecular a m/z 557) y compuesto 21 (tR 30,12 min, ion pseudomolecular en m/z 559), con iones de fragmentos a m/z 373 y m/z 149, también se clasificaron como derivados geniposídicos, aunque su identificación no fue determinada. Estos compuestos se detectaron a niveles de 1,44 mg/g y 1,43 mg/g de planta respectivamente.

Los compuestos 6, 9, 10, 12, 15-17, mostraron las características del espectro UV de los ácidos hidroxicinámicos. Entre estos, los compuestos 12, 15, 16 y 17 se identificaron como isómeros verbascósidos. El compuesto 12 fue el más abundante, alcanzando 5,33 mg/g de planta. Estos cuatro compuestos presentaron los mismos espectros UV y el mismo ion pseudomolecular ( $[M-H]^-$ ) a m/z 623, con patrones de fragmentación similares (fragmentos de iones en m/z 461, 161, 315 y/o 179). Los compuestos 9 y 10 se identificaron como verbascósidos hidroxilados llamado  $\beta$  OH-acteósido (0,76 mg/g de planta y 0,79 mg/g de planta, respectivamente). Su ion molecular se encontró en m/z 639 con un ion de fragmento principal a m/z 621, seguido de otro en m/z 161.

Los flavonoles también se identificaron en LG. Los compuestos 18 y 19 mostraron iones pseudomoleculares a m/z 491 y 477 respectivamente, con un ion de fragmento principal a m/z 315 ( $[isorhamnetina-H]^-$ ), es decir, pérdidas de 176 y 162, respectivamente. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la posición normal de la glucosilación de flavonoles es el grupo hidroxilo en el C-3, se identificaron como isorhamnetina 3-O-glucurónido (1,73 mg/g de planta) e isorhamnetina 3-O-glucósido (2,20 mg/g de planta), respectivamente. El compuesto 14, que mostró un ion pseudomolecular en m/z 637 y un fragmento mayor de iones en m/z 315 ( $[isorhamnetina-H]^-$ ), se identificó como isorhamnetina rhamnosil-glucurónido (1,25 mg/g de planta). Todos estos compuestos mostraron el espectro UV característico de flavonoles (Tabla 2). Solo el compuesto 3 se identificó como un derivado del ácido quínico, ya que su ion molecular era detectado a m/z 353 con fragmento de iones a m/z 191. Se denominó ácido 3-cafeoil-quínico (0,42 mg/g de planta).

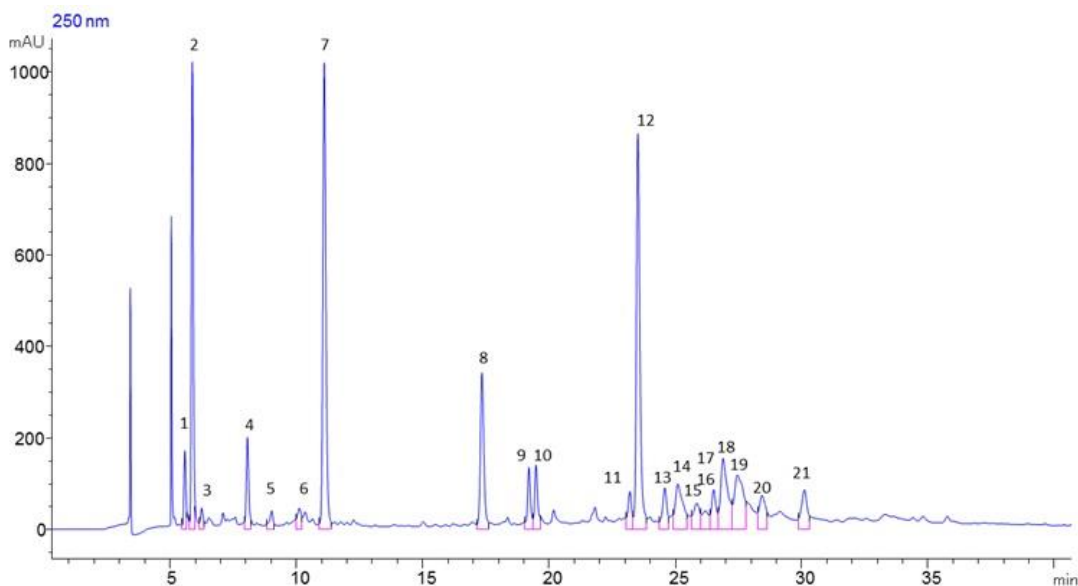


Figura 5. Análisis cromatográfico (HPLC) de extracto de *Lantana grisebachii*. Identificación de 21 compuestos fenólicos.

- ***Aspidosperma quebracho-blanco***

En la tabla 3 se muestra el perfil fenólico de AQB. Se identificaron 31 compuestos fenólicos (Figura 6), con predominio de derivados del ácido hidroxibenzoico (compuestos 3, 4, 6-10, 12, 13, 15, 18, 31). Los compuestos 3 y 13, definidos como gentisoil- hexósido (0,49 mg/g y 1,29 mg/g de planta, respectivamente), mostraron un ion pseudomolecular a  $m/z$  315, con fragmentos de iones en  $m/z$  153 ([ácido gentísico-H]<sup>-</sup>) y  $m/z$  109. El compuesto 18, que muestra un ion pseudomolecular a  $m/z$  477 y el mismo patrón de fragmentación ( $m/z$  153 ([ácido gentísico-H]<sup>-</sup>) y  $m/z$  109) se identificó como gentisoil-dihexósido (1,30 mg/g de planta). El compuesto 9 (ion molecular a  $m/z$  389) y el compuesto 15 (ion molecular a  $m/z$  375) presentaron características de derivados del ácido ftálicos, este último identificado como ácido trihidroxiftálico hexósido (concentraciones: 0,10 mg/g y 1,43 mg/g de planta, respectivamente).

Dentro de los derivados del ácido hidroxibenzoico, se identificó el ácido protocatechuico (compuesto 12) que muestra un ion pseudomolecular a  $m/z$  153 ([M-H]<sup>-</sup>), y se identificó el compuesto 6 como ácido protocatechuico hexósido ([M-H]<sup>-</sup>) con  $m/z$  315 y un ion de

fragmento principal a  $m/z$  153 ([ácido protocatechuico-H]<sup>-</sup>). Sus concentraciones fueron 0,41 mg/g y 0,13 mg/g de planta, respectivamente.

El compuesto 7 se identificó como ácido gálico ([M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  169). Su concentración fue 1,30 mg/g de planta. De manera similar, el compuesto 10, identificado como galoil-glucosa (M-H)<sup>-</sup>  $m/z$  331 con los fragmentos principales de iones a  $m/z$  169 ([ácido gálico-H]<sup>-</sup>) y con  $m/z$  151 ([ácido gálico-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>), también se encontró, pero en cantidades más bajas (0,03 mg/g de planta).

Otros compuestos identificados dentro de los ácidos hidroxibenzoicos fueron los compuestos 4, 8 y 31. A  $t_R$  8,21 min, el compuesto 4 mostró una [M-H]<sup>-</sup> con  $m/z$  151 y se identificó como vainillina (0,23 mg/g de planta). El ácido siríngico (compuesto 8, 0,07 mg/g de la planta) fue identificado por su ion pseudomolecular en  $m/z$  197 ([M-H]<sup>-</sup>) y su patrón de fragmentación (fragmentos de iones en  $m/z$  153 y 135). Finalmente, el ácido elágico (compuesto 31) [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  301, con fragmentos de iones a  $m/z$  257, 153 y 109, alcanzó 0,18 mg/g de planta.

Dos compuestos de extracto de AQB se identificaron como derivados de ácido quínico. El compuesto 5, a una concentración de 0,07 mg/g de planta, se definió como ácido clorogénico (5-ácido cafeoil-quínico) basado en su  $t_R$  y en su ion pseudomolecular a  $m/z$  353 ([M-H]<sup>-</sup>). El compuesto 11 se identificó como ácido 1-cafeoil-quínico porque el ion molecular fue  $m/z$  353 con fragmentación a  $m/z$  191.

Varios compuestos identificados en AQB (compuestos 19-23, 25 y 29) exhibieron características de los flavonoles (espectros UV  $\lambda_{max} \sim 360$  nm). Los compuestos 19 y 25 mostraron un ion pseudomolecular en  $m/z$  771 y 609, respectivamente, y en ambos casos, el principal fragmento de ion se detectó a  $m/z$  301 ([quercetina-H]<sup>-</sup>). En base a su patrón de fragmentación se definieron como quercetina 3-O-glucosil-rhamnosil-glucósido (0,73 mg/g de planta) y quercetina 3-O-rutinósido (0,43 mg/g de planta), respectivamente. Considerando sus tiempos relativos de retención cromatográfica, espectros UV-Vis y espectrofotometría de masa, los compuestos 20 y 21 se identificaron como kaempferol 3-O glucosil-ramnosil-galactósido (de la primera elución cromatográfica) y kaempferol 3-O-glucosyl-ramnosyl-glucósido, que mostró un ion pseudomolecular a  $m/z$  775 con un ion de

fragmento de MS2 principal a  $m/z$  285. Sus concentraciones fueron de 0,20 y 0,36 mg/g de planta respectivamente. Los compuestos 22 (0,42 mg/g de planta) y 23 (0,32 mg/g de planta) mostraron un ion molecular a  $m/z$  785 con un ion de fragmento principal a  $m/z$  315 ([isorhamnetina-H]<sup>-</sup>). Ellos fueron identificados como isorhamnetina 3-O-glucosil-rhamnosil-galactósido e isorhamnetina 3-O-glucosil-rhamnosil-glucósido (flavonoles), respectivamente, de acuerdo con su patrón de fragmentación y tR cromatográfica. El compuesto 29, que presentó un ión pseudomolecular en  $m/z$  623 con fragmentos MS2 a  $m/z$  315 ([isorhamnetina-H]<sup>-</sup>), fue identificado como isorhamnetina 3-O-rutinósido (0,18 mg/g de planta).

Los flavonoides monoméricos también se encontraron en la AQB. El compuesto 24, se identificó como catequina por su ion pseudomolecular en  $m/z$  289 y los iones en fragmentos a  $m/z$  245 y 137 (0,15 mg/g de planta), y el compuesto 27 como epicatequina (0,26 mg/g de planta) que mostró el mismo ion molecular y fragmentos de iones a  $m/z$  245, 137 y 151.

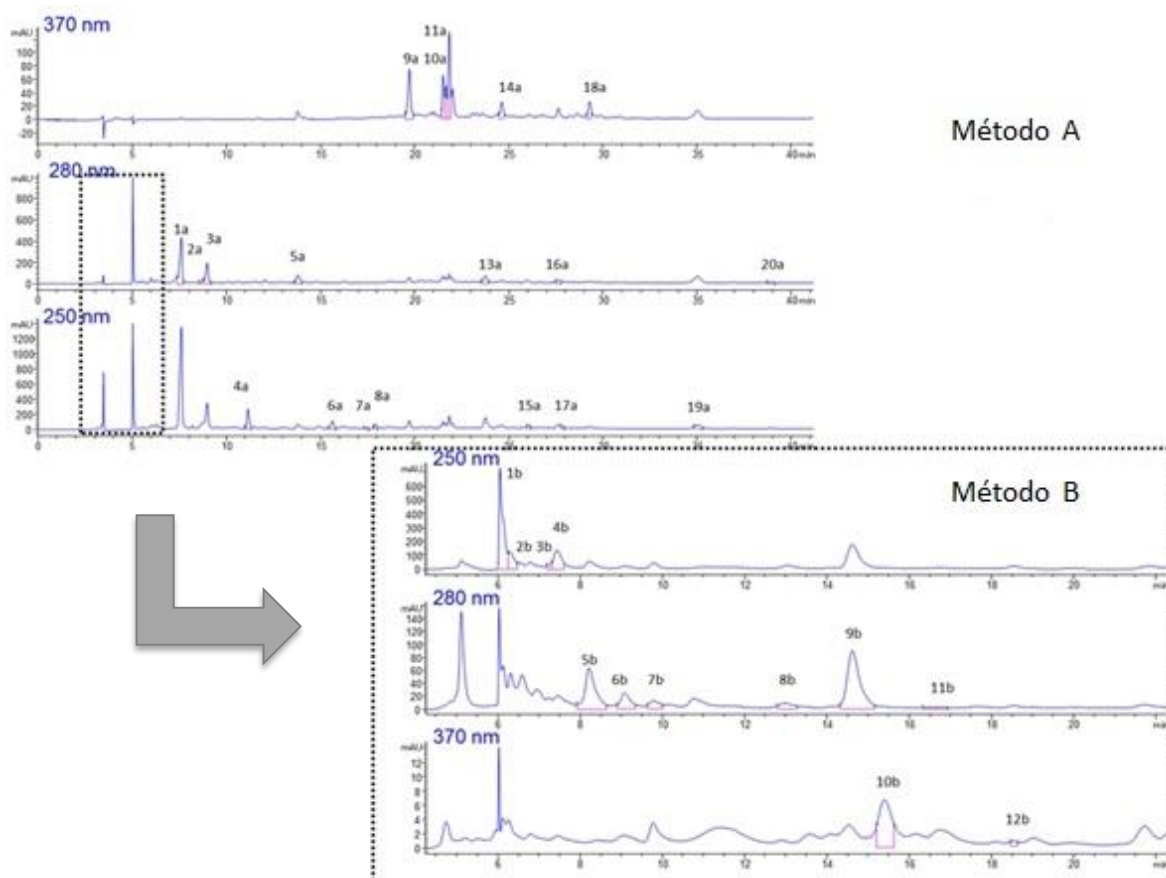


Figura 6. Análisis cromatográfico (HPLC) de extracto de *Aspidosperma quebracho-blanco*. Identificación de 31 compuestos fenólicos. Arriba: método de análisis A (García-Estévez et al, 2010). Abajo: método de análisis B (García-Estévez et al, 2012).

- ***Ilex paraguariensis***

En la tabla 4 se muestra el perfil fenólico de IP. Se identificaron 23 fenoles (Figura 7), donde el 85% de los compuestos (compuestos 1, 4-6, 9-11, 13, 14, 16-23) mostró el espectro UV característico de los derivados del ácido quínico ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 326 \text{ nm}$ ). Los compuestos 4, 5, 9 y 11 mostraron un ion pseudomolecular a  $m/z$  353 y fueron identificados como isómeros de ácido cafeoil-quínico. Sus identidades fueron asignadas dependiendo de las diferentes intensidades relativas de fragmentación (Ferrerres et al, 2014). El compuesto 4 mostró fragmentos de iones a  $m/z$  191(100), 79(49), 135(27) y se identificó como ácido 3-cafeoil-quínico (1 mg/g de la planta), y el compuesto 5, que mostró fragmentos de iones a  $m/z$  191(100), 179(5) y 135(3), se identificó como ácido 5-cafeoil-quínico (ácido clorogénico). Este compuesto fenólico fue el más abundante (28,82 mg/g de planta). El compuesto 11

también mostró fragmentos de 191(100) y 179(4) y, dada la ausencia de otros fragmentos, se identificó como 1-ácido cafeoil-quinico (17,71 mg/g de planta). Finalmente, el compuesto 9 mostró una mayor intensidad en el fragmento 173(100), 179(90), 135(70) y el más bajo en 191(75) y, por lo tanto, fue identificado como ácido 4-cafeoil-quinico (11,71 mg/g de planta).

Los compuestos 16, 17, 19 y 22 presentaron un ion pseudomolecular a  $m/z$  515 y un ion de fragmento principal en  $m/z$  353(100), que puede corresponder a las características de ácidos dicafeoil-quinicos. Dadas sus diferentes intensidades de fragmentación, fueron identificados al compararlos con los reportados en la literatura (Clifford et al, 2007; Sousa et al, 2015). El compuesto 16, que mostró fragmentos de iones a  $m/z$  353(100), 173(60), 335(20), se definió como 4,3-ácido dicafeoil-quinico (4,3 mg/g de planta) y el compuesto 17, con fragmentos de iones a  $m/z$  353(100), 191(80), 179(60), fue identificado como ácido 1,3-dicafeoil-quinico (18,66 mg/g de planta).

El compuesto 19 también mostró fragmentación de  $m/z$  353(100), 173(90), 179(70), 191(50), 203(20), y se identificó como ácido 1,4-dicafeoil-quinico (6,99 mg/g de planta). Finalmente, el compuesto 22 se definió como ácido 4,5-dicafeoil-quinico (0,62 mg/g de planta) basado en su patrón de fragmentación (fragmentos de iones a  $m/z$  353(100), 173(70) y 179(50)).

Los compuestos 10, 13 y 14 mostraron un ion pseudomolecular a  $m/z$  367, que es característico de los ácidos feruloil-quinicos. En función de sus patrones de fragmentación (Clifford et al, 2007; Sousa et al, 2015), se identificaron, respectivamente, como ácido 3-feruloil-quinico (fragmentos de iones a  $m/z$  193(100) y 134(15)), ácido 4-feruloil-quinico (fragmentos de iones a  $m/z$  173(100) y 191(29)) y 5-ácido feruloil-quinico (iones MS2 a  $m/z$  191(100) y 173(12)). Las cantidades determinadas de cada isómero fue 2,19 mg/g, 1,18 mg/g y 1,49 mg/g de planta, respectivamente.

Los compuestos 20, 21 y 23 mostraron un ion molecular a  $m/z$  529, que se puede relacionar con estructuras de ácido cafeoil-feruloil-quinico. Los diferentes isómeros fueron identificados comparando su patrón de fragmentación MS2 con los reportados previamente (Clifford et al, 2007; Sousa et al, 2015). El compuesto 20, identificado como

ácido 3,5-cafeoil-feruloil-quínico (3F, 5C), mostró una fragmentación de iones a  $m/z$  367(100), 193(80) ([ácido ferúlico-H]<sup>-</sup>) y 134(20) y su concentración fue 0,93 mg/g de planta. El compuesto 21 se identificó como ácido 3,5-cafeoil-feruloil-quínico (3C, 5F), ya que mostró fragmentos de iones a  $m/z$  353(100) ([ácido cafeoil-quínico-H]<sup>-</sup>), 191(80) ([ácido quínico-H]<sup>-</sup>) y 179(60) ([ácido cafeico-H]<sup>-</sup>). Su concentración fue de 0,66 mg/g de planta. Finalmente, el compuesto 23, con valores de 0,83 mg/g de planta, se definió como 3,4-ácido cafeoil-feruloil-quínico (3C, 4F) debido a su patrón de fragmentación ( $m/z$  367(100) y 173(80)).

Los compuestos 7 y 8, identificados como derivados hidroxicinámicos, se definieron como ácido cafeoil-glucosa (1,19 mg/g y 1,03 mg/g de planta, respectivamente). Estos presentaron [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  341 y fragmentación de MS2 a  $m/z$  179, 161 y 135.

Los flavonoles también se encontraron en el extracto de IP. El compuesto 15 mostró un ion molecular en  $m/z$  609 con un ion de fragmento principal a  $m/z$  301 ([quercetina-H]<sup>-</sup>), por lo que se definió como quercetina rutinósido (6,16 mg/g de planta). Del mismo modo, el compuesto 18 se definió como isorhamnetina rutinósido (0,34 mg/g de planta) basado en su ion molecular a  $m/z$  623 y fragmento de ion a  $m/z$  315 ([isorhamnetina-H]<sup>-</sup>).

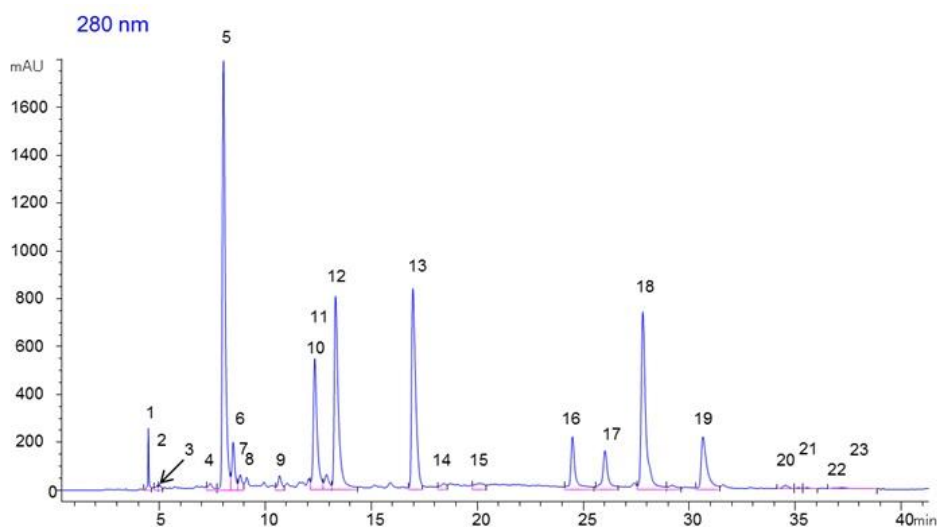


Figura 7. Análisis cromatográfico (HPLC) de extracto de *Ilex paraguariensis*. Identificación de 23 compuestos fenólicos.

Los estándares utilizados para identificar y cuantificar los compuestos identificados (entre paréntesis) fueron ácido gálico (compuestos 1, 4, 14 de LG; 1-3, 7, 9, 10, 13-18, 26, 28, 30 de AQB y 2, 3, 12 de IP), ácido protocatechuico (compuestos 6 y 12 de AQB), ácido clorogénico (compuesto 3 de LG; 5, 11 de AQB y 1, 4-6, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19-23 de IP), ácido cafeico (compuestos 9, 10, 12, 15-17 de LG y 7-8 de IP), ácido vainílico (compuesto 4 de AQB), ácido sirínico (compuesto 8 de AQB), ácido p-cumárico (compuesto 6 de LG), ácido elágico (compuesto 31 de AQB), ácido geniposídico (compuestos 2, 5, 7, 8, 11, 13, 20, 21 de LG), epicatequina (compuesto 27 de AQB), catequina (compuesto 24 de AQB), quercetina 3-O-glucósido (compuesto 19 de AQB); quercetina 3-O-rutinósido (compuesto 25 de AQB y 15 de IP), isorhamnetina 3-O-glucósido (compuestos 18-19 de LG y 22-23 de AQB), isorhamnetina 3-O-rutinósido (compuesto 29 de AQB y 18 de IP), y kaempferol 3-O-glucósido (compuestos 20-21 de AQB).



Tabla 2. Características cromatográficas (t<sub>R</sub>), espectro de masa, espectro UV (λ<sub>max</sub>), identificación tentativa y concentración de compuestos fenólicos (mg/g de extracto seco) en el extracto de *Lantana grisebachii*.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos de iones (m/z)	UV λ <sub>max</sub> (nm)	Identificación	Grupo	mg/g de extracto seco	%
1	5,56	282	150, 133	254, 274(sh)	Desconocido	-	2,94	1,75
2	5,86	391	167, 123, 149	236	Dihidrotevesido	Iridoides	26,75	15,91
3	6,24	353	191	326, 298(sh)	3- ácido cafeoil-quinico	Derivados de AQ	1,64	0,98
4	8,04	375	169, 151, 213	238	Desconocido	-	3,80	2,26
5	9,01	373	167, 211, 123, 149, 193	232, 314	Ácido geniposídico	Iridoides	1,77	1,05
6	10,11	487	179, 135, 161	332, 300(sh)	Hesperidósido cumárico	Derivados de AH	1,19	0,71
7	11,09	389	345, 121, 165, 209, 139	236	Tevesido	Iridoides	41,69	24,79
8	17,36	403	371, 127, 191, 121, 139	234	Teviridosido	Iridoides	15,47	9,20
9	19,20	639	621, 161, 179, 459, 529	330, 296(sh)	β OH-Acteoside*	Derivados de AH	2,93	1,74
10	19,49	639	621, 161, 179, 459, 529	330, 296(sh)	β OH-Acteoside*	Derivados de AH	3,04	1,81
11	23,18	537	163, 373, 313, 331, 119, 149	232, 296(sh), 312	Ácido geniposídico cumárico	Iridoides	3,71	2,20
12	23,51	623	461, 161, 315, 179	246, 294(sh), 332	Isómero Verbascósido	Derivados de AH	20,56	12,22
13	24,58	567	193, 373, 343, 149, 361	326, 296(sh)	Ácido feruloil-geniposídico Isorhamnetina O-rhamnosil- glucurónido	Iridoides	4,59	2,73
14	25,08	637	315, 301	364, 300 (sh)		Flavonoles	4,84	2,88
15	25,83	623	461, 161, 315	328, 292(sh)	Isómero Verbascósido	Derivados de AH	2,15	1,28
16	26,19	623	461, 161, 315, 179	328, 292(sh)	Isómero Verbascósido	Derivados de AH	1,96	1,17
17	26,52	623	461, 161	328, 292(sh)	Isómero Verbascósido	Derivados de AH	2,89	1,72
18	26,89	491	315	360, 299 (sh)	Isorhamnetina 3-O-glucurónido	Flavonoles	6,67	3,96
19	27,46	477	315	362, 299 (sh)	Isorhamnetina 3-O-glucósido	Flavonoles	8,51	5,06
20	28,42	557	373, 149, 133	230, 326	Derivado del ácido geniposídico	Iridoides	5,55	3,30
21	30,12	559	373, 149, 185	230, 296(sh), 330	Derivado del ácido geniposídico	Iridoides	5,53	3,29

\*Verbascósido hidroxilado;

AQ: Derivados del ácido quinico

AH: derivados del ácido hidroxicinámicos

Tabla 3. Características cromatográficas (t<sub>R</sub>), espectro de masa, espectro UV (λ<sub>max</sub>), identificación tentativa y concentración de compuestos fenólicos (mg/g de extracto seco) en extracto de *Aspidosperma quebracho-blanco*.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos de iones (m/z)	UV λ <sub>max</sub> (nm)	Identificación	Grupo	mg/g de extracto seco	%
1*	7,31	295	161	260	Desconocido	-	0,71	0,80
2*	7,43	237	191, 135, 121	250	Desconocido	-	4,80	5,40
3	7,54	315	153, 109	240, 306	Gentisoil-hexósido	Derivados del AHB	2,52	2,83
4*	8,22	151	109, 133	268	Vanillina	Derivados del AHB	1,21	1,35
5	8,62	353			Ácido clorogénico	Derivados del AQ	0,37	0,42
6	8,91	315	153, 109	260, 294	Ácido protocatechuico hexósido	Derivados del AHB	0,66	0,74
7*	9,08	169	125	270	Ácido gálico	Derivados del AHB	6,70	7,52
8*	9,79	197	153, 135	274	Ácido siríngico	Derivados del AHB	0,36	0,40
9*	11,05	389	345, 121, 165, 209	234, 326	Derivados del ácido ftálico	Derivados del AHB	0,50	0,56
10*	12,99	331	169, 151	271	Galoil-glucosa	Derivados del AHB	0,14	0,16
11	13,72	353	191	326, 298(sh)	1-ácido cafeoil-quinico	Derivados del AQ	10,89	12,24
12*	14,62	153	109	259, 294	Ácido protocatechuico	Derivados del AHB	2,12	2,38
13*	15,4	315	153, 109	263, 317	Gentisoil-hexósido	Derivados del AHB	6,66	7,49
14	15,56	403	357, 125, 151, 191	246	Desconocido	-	4,34	4,88
15*	16,74	375	213, 169, 107		Ácido trihidroxi-ftálico hexósido	Derivados del AHB	7,34	8,24
16	17,36	371	249, 121, 353, 231	232, 274	Desconocido	-	3,28	3,69
17	17,80	403	371, 121, 191, 223	236	Desconocido	-	5,24	5,89
18*	18,54	477	153, 109		Gentisoil-dihexósido	Derivados del AHB	6,69	7,51
19	19,61	771	301	364, 300(sh)	Quercetina glucosil-rhamnosil-glucósido	Flavonoles	3,73	4,20
20	21,38	775	285	365, 300(sh)	Kaempferol glucosil-rhamnosil-galactósido	Flavonoles	1,05	1,18
21	21,53	775	285	364, 298(sh)	Kaempferol glucosil-rhamnosil-glucósido	Flavonoles	1,85	2,08
22	21,70	785	315	361, 302(sh)	Isorhamnetina glucosil-rhamnosil-galactósido	Flavonoles	2,16	2,43
23	21,87	785	315	361, 302(sh)	Isorhamnetina glucosil-rhamnosil-glucósido	Flavonoles	1,63	1,83
24	23,63	289	245, 137	278	Catequina	Flavonoles	0,76	0,85
25	24,42	609	301	368	Quercetina rutinósido	Flavonoles	2,20	2,47

26	25,80	507	463, 153, 353	306	Desconocido	-	1,86	2,09
27	27,40	289	245, 137, 151	270	Epicatequina	Flavanoles	1,34	1,51
28	27,50	417	181, 387, 167, 151, 403	262, 306	Desconocido	-	4,68	5,26
29	29	623	315	362, 298(sh)	Isorhamnetina 3-O-rutinósido	Flavonoles	0,93	1,05
30	35,12	389	181, 275, 345, 285	274, 308, 376	Desconocido	-	1,37	1,53
31	38,73	301	257, 153, 109	268, 344	Ácido elágico	Derivados del AHB	0,93	1,05

\*Estos compuestos fueron determinados del cromatograma obtenido en el análisis de la muestra utilizando el método cromatográfico descrito en García-Estévez et al, 2010.

AHB: Derivados del ácido hidroxibenzoico;

AQ: Derivados del ácido quínico

Tabla 4. Características cromatográficas (t<sub>R</sub>), espectro de masa, espectro UV (λ<sub>max</sub>), identificación tentativa y concentración de compuestos fenólicos (mg/g de extracto seco) en extracto de *Ilex paraguariensis*.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos de iones (m/z)	UV λ <sub>max</sub> (nm)	Identificación	Grupo	mg/g de extracto seco	
								%
1	4,47	191	111, 129	266	Ácido quínico	Derivados de AQ	3,28	1,38
2	4,88	371	191, 173, 135	252, 278	Desconocido	-	0,59	0,25
3	5,018	473	189, 351, 221, 311	294	Desconocido	-	0,61	0,26
4	7,41	353	191(100), 179(49), 135(27)	326, 298(sh)	3-Ácido cafeoil-quínico	Derivados de AQ	2,01	0,85
5	8,04	353	191(100), 179(50), 135(30)	326, 296(sh)	5-Ácido cafeoil-quínico <sup>1</sup>	Derivados de AQ	57,80	24,37
6	8,50	391	217, 179, 135	272	3-Ácido disuccinoyl-quínico	Derivados de AQ	7,44	3,13
7	8,83	341	161, 179, 203, 135	328, 300(sh)	Ácido cafeoil glucosa	Derivados de AH	2,39	1,01
8	10,67	341	179, 161, 221, 135	328, 300(sh)	Ácido cafeoil glucosa	Derivados de AH	2,06	0,87
9	12,33	353	173(100), 179(90), 191(75), 135(70)	326, 298(sh)	4-ácido cafeoil-quínico	Derivados de AQ	23,49	9,91
10	12,89	367	193(100), 134(15)	324, 294(sh)	3-Ácido feruloil-quínico	Derivados de AQ	4,40	1,85
11	13,31	353	191(100), 179(4)	326, 300(sh)	1-Ácido cafeoil-quínico	Derivados de AQ	35,52	14,98
12	16,96	427	161, 179	274	Desconocido	-	12,99	5,48
13	18,43	367	173(100), 191(29)	322, 292(sh)	4-Ácido feruloil-quínico	Derivados de AQ	2,37	0,99
14	20,12	367	191(100), 173(12)	324, 296(sh)	5-Ácido feruloil-quínico	Derivados de AQ	2,99	1,26
15	24,49	609	301	364, 300(sh)	Quercetina rutinósido	Flavonoles	12,36	5,21
16	26,12	515	353(100), 173(60), 335(20)	326, 298(sh)	3,4-Ácido dicafeoil-quínico	Derivados de AQ	8,62	3,63
17	27,80	515	353(100), 191(80), 179(60)	328, 298(sh)	1,3Ácido dicafeoil-quínico	Derivados de AQ	37,43	15,78
18	29,18	623	315	362, 300(sh)	Isorhamnetina rutinósido	Flavonoles	0,69	0,29
19	30,66	515	353(100), 173(90), 179(70), 191(50), 203(20)	328, 300(sh)	1,4-Ácido dicafeoil-quínico	Derivados de AQ	14,03	5,92
20	34,53	529	367(100), 193(80), 134(20)	324, 294(sh)	3,5-ácido cafeoil-feruil quínico <sup>2</sup>	Derivados de AQ	1,86	0,79
21	35,15	529	353(100), 191(80), 179(60)	324, 294(sh)	3,5-ácido cafeoil-feruloil quínico <sup>3</sup>	Derivados de AQ	1,32	0,56
22	35,55	515	353(100), 173(70), 179(50)	326, 298(sh)	4-5-ácido dicafeoil quínico	Derivados de AQ	1,25	0,53
23	37,19	529	367(100), 173(80)	328, 300(sh)	3,4-ácido cafeoil-feruloil quínico <sup>4</sup>	Derivados de AQ	1,67	0,70

AQ: derivados del ácido quínico; AH: derivados del ácido hidroxibenzoico; 1 ácido clorogénico; 2 3,5-Cafeoil-feruloil quínico (3F,5C); 3 3,5-Cafeoil-feruloil quínico (3C,5F); 4 3,4-Cafeoil-feruloil quínico (3C,4F).

### **3.2. Bioactividad *in vitro* de los fitoextractos**

#### **Viabilidad celular**

La viabilidad celular de las líneas C6 y T98-G no se modificó significativamente por los extractos (LG, AQB e IP) con respecto al Control (C). Los extractos no mostraron toxicidad en el rango de dosis empleado (Figura 8).

#### **Liberación de IL-6**

Se observó que el extracto de IP redujo significativamente la liberación de IL-6 en células C6 ( $p < 0,05$ ), sin actividad en células T98-G.

Por otro lado, el extracto de AQB indujo la liberación de IL-6 por ambas líneas celulares de una manera dependiente de la dosis, mientras que el extracto LG redujo la liberación de IL-6 por las células C6 (no significativo) y no tuvo efecto sobre las células T98-G.

Teniendo en cuenta estos resultados, se podría sugerir un efecto proinflamatorio de AQB (ambas líneas celulares) y un efecto anti-inflamatorio de IP (línea celular C6;  $p < 0,05$ ). Por último, LG no mostró efecto sobre la liberación de esta citoquina (Figura 8).

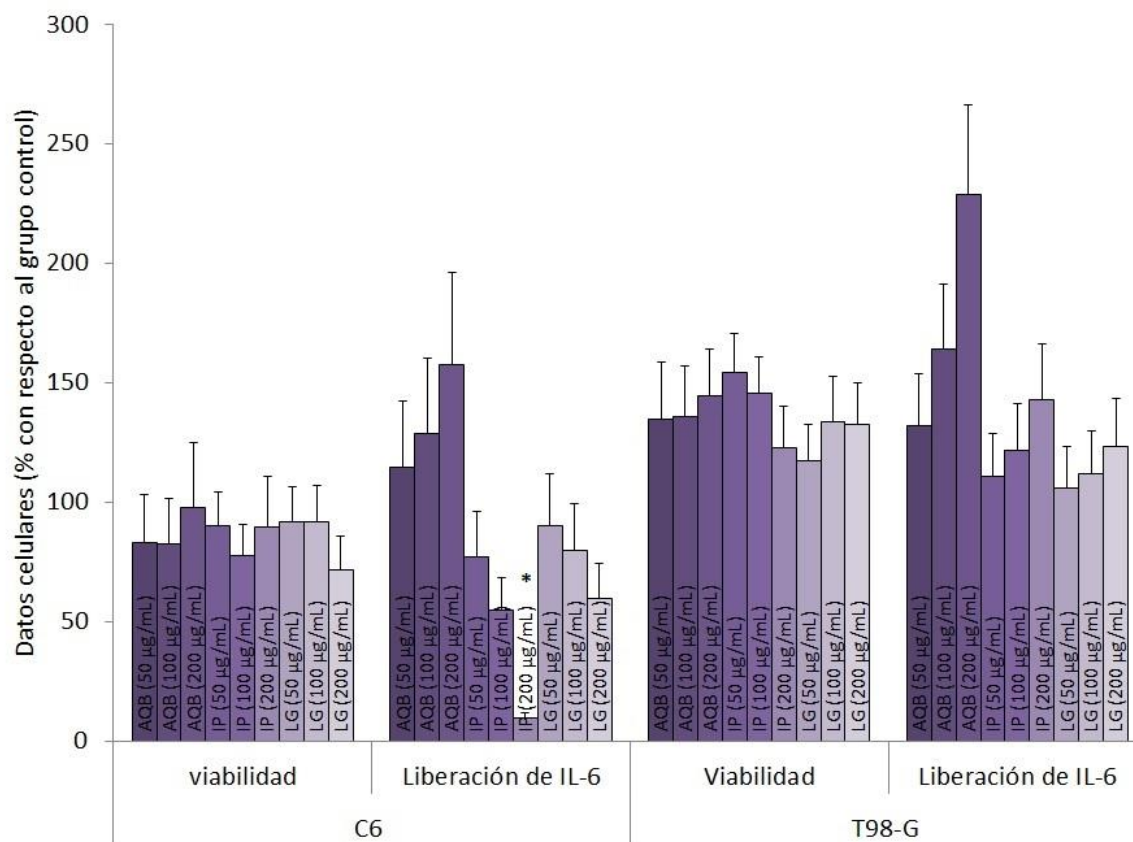


Figura 8. Viabilidad y liberación de IL-6 en células T98-G y C6 tratadas con distintas concentraciones de LG, ABQ o IP (LG: *Lantana grisebachii*; AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*; IP: *Ilex paraguariensis*). Resultados expresados como porcentaje de la media  $\pm$  EE respecto al grupo control: C=100%). \*  $p < 0,05$ .

### Perfil de AG de células tratadas

Se estudió el efecto de los extractos (distintas dosis) sobre el perfil de AG de las células tratadas y el grupo C, dado el rol fundamental que juegan los lípidos en el desarrollo de los procesos inflamatorios celulares. Los resultados de estas variaciones en el perfil lipídico se presentan en familias de AG (ver sección 2.2) y se expresan en porcentaje con respecto al C (C=100%).

Se observó que la línea celular C6 tratada con LG mostró cantidades decrecientes de AG  $\omega$ -9 (38%), AG saturados (30%),  $\omega$ -6 (22%) y  $\omega$ -3 (10%) (Figura 9). Se encontraron cantidades similares en las células tratadas con AQB, aunque mostraron mayores cantidades de los primeros (AG  $\omega$ -9 (40%) y AG saturados (38%) y menores de AG  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3 (Figura 9). Los AG

$\omega$ -7 (32%) fueron los principales en las células tratadas con IP, seguidos de AG  $\omega$ -9 (30%), AG saturados (24%), AG  $\omega$ -6 (10%) y AG  $\omega$ -3 (4%) (Figura 9).

Por otro lado, las células T98-G tratadas con LG mostraron de forma decreciente AG  $\omega$ -9 (37%), AG  $\omega$ -6 (25%), AG  $\omega$ -7 (15%), AG saturados (15%) y AG  $\omega$ -3 (8%), mientras que AQB aumentó AG  $\omega$ -9 (45%), AG saturados (18%) y AG  $\omega$ -7 (18%), pero disminuyó AG  $\omega$ -6 (17%) y  $\omega$ -3 (3%). De manera similar, el tratamiento con IP mostró cantidades decrecientes de AG  $\omega$ -9 (46%), AG  $\omega$ -7 (20%), AG saturados (20%), AG  $\omega$ -6 (9%) y AG  $\omega$ -3 (5%) (Figura 9).

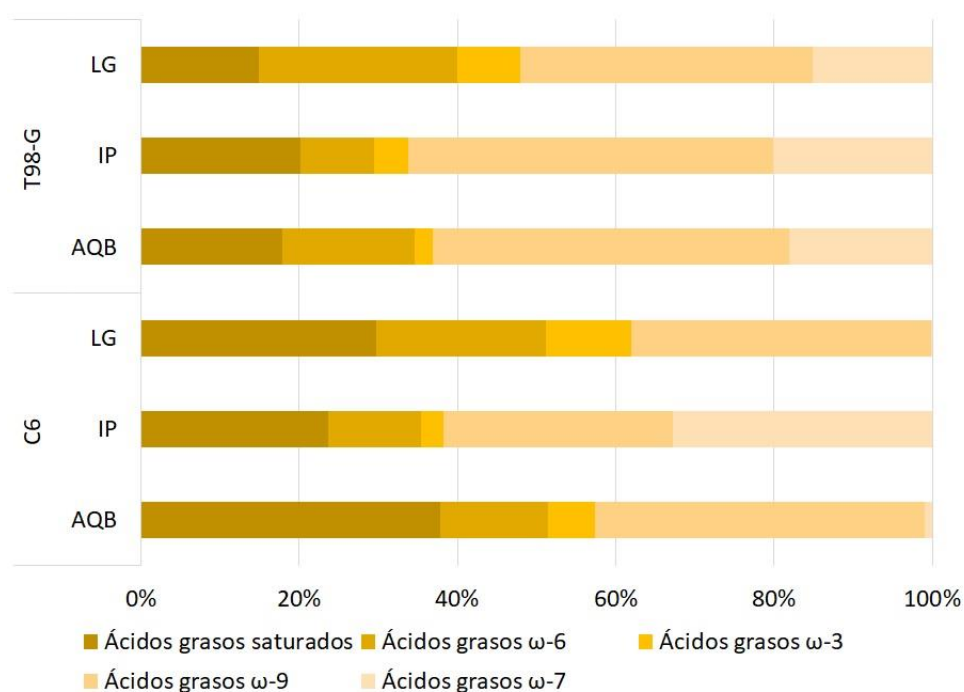


Figura 9. Ácidos grasos agrupados por familias luego de los tratamientos con fitoextractos. LG: *Lantana grisebachii*, AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco* e IP: *Ilex paraguariensis*, en líneas celulares T98-G y C6, expresados en porcentaje con respecto al C (%).

A su vez, se interpretaron los resultados en relación al rol que ejerce cada familia de AG sobre la respuesta inflamatoria según los datos reportados en la bibliografía. Así, se determinaron los AG saturados y  $\omega$ -6 como AG proinflamatorios (García-Casal et al, 2014; Sears, 2015) y los AG  $\omega$ -9,  $\omega$ -3 y  $\omega$ -7 como AG anti-inflamatorios (Mesa-García et al, 2006; Sánchez et al, 2007).

En ambas líneas celulares, C6 y T98-G, la cantidad de AG proinflamatorios fue mayor en los tratamientos con LG y AQB mientras que los AG anti-inflamatorios mostraron mayor concentración en células tratadas con IP (Figura 10).

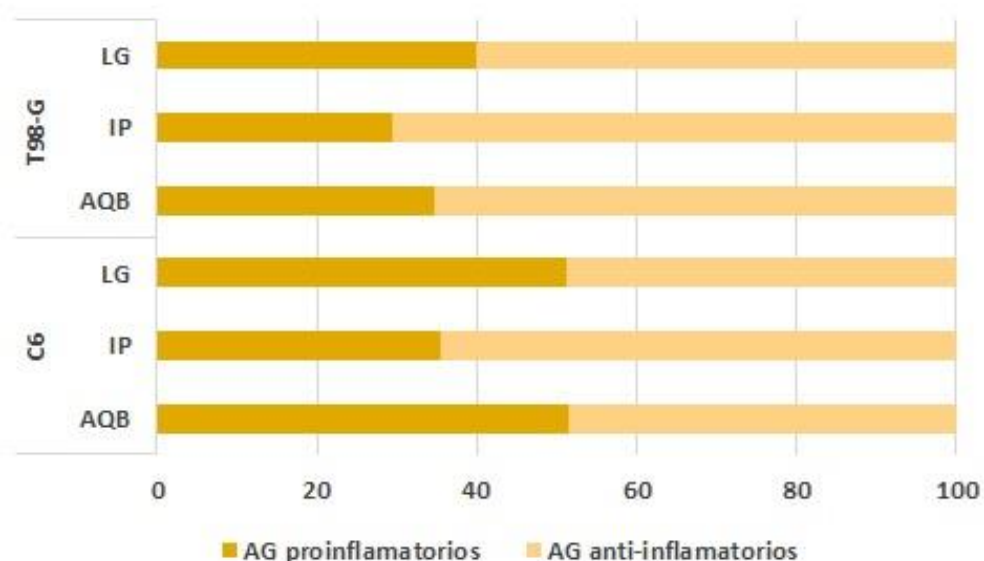


Figura 10. AG agrupados en proinflamatorios y anti-inflamatorios observados luego de tratamientos con fitoextractos. Líneas celulares T98-G y C6, expresados en porcentaje (%). LG: *Lantana grisebachii*; AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*; IP: *Ilex paraguariensis*.

### 3.3. Análisis de Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión (PLS) se usó para correlacionar las respuestas de ambas líneas celulares expuestas a los extractos y para discriminar los efectos de cada compuesto identificado en los fitoextractos por HPLC-DAD-MS.

Los resultados mostraron que los niveles de liberación de IL-6 están inversamente relacionados con los niveles de AG de la familia  $\omega$ -7, que estuvo representada por el ácido palmítico (16:1) (Figura 11). Los compuestos de LG se relacionaron con AG poliinsaturados ( $\omega$ -6 y  $\omega$ -3), sin asociación con la liberación de IL-6. Los compuestos de AQB, en las células T98-G se relacionaron directamente con la liberación de IL-6 y, con menor intensidad, con  $\omega$ -9 y AG saturados (Figura 11). Los compuestos de IP se relacionaron principalmente con niveles mayores de AG  $\omega$ -7, seguidos de  $\omega$ -9 y saturados. Además, estos



compuestos estaban inversamente relacionados con la liberación de IL-6. El ácido clorogénico se identificó como el principal compuesto activo en las células C6, siendo uno de los principales ácidos fenólicos identificados en IP (1-cafeoil-quinico, 5-cafeoil-quinico, 1,3-dicafeoil-quinico) (Figura 11).

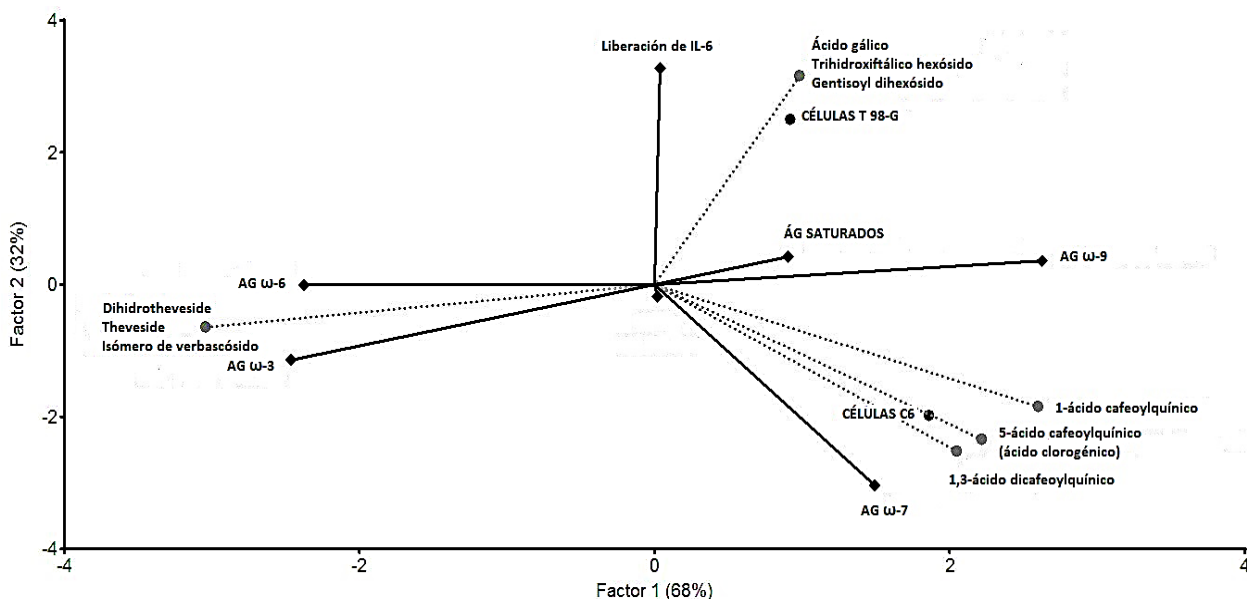


Figura 11. Correlaciones entre los compuestos fenólicos de los extractos con la liberación de IL-6, viabilidad celular y concentración de AG en líneas celulares T 98-G y C6. Principales compuestos de *Lantana grisebachii*: dihidrotevesido, tevesido e isómero verbascósido; de *Aspidosperma quebracho-blanco*: ácido gálico, trihidroxiftálico hexósido y gentisoil hexósido; de *Ilex paraguariensis*: 1-ácido cafeoil-quinico, 1,3-ácido dicafeoil-quinico y 5-ácido cafeoil-quinico (ácido clorogénico). La longitud de la línea indica la intensidad de la variable relativa y los grados de separación de línea indican la correlación entre variables, siendo por ej.:  $<90^\circ$  = positivo;  $90^\circ$  = nulo;  $>90^\circ$  = negativo.

### 3.4. Bioactividad *in vivo* de los fitoextractos en ratones sanos

Se realizó el primer ensayo murino con ratones sanos de ambos sexos (sección 2.3) y se determinaron fenoles totales (FT), peróxidos acuosos y lipídicos (PA y PL), la actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa (GGT) y el anión superóxido (SO) en el encéfalo total y cada una de las regiones encefálicas obtenidas, a fin de conocer el efecto redox de los fitoextractos estudiados.

A continuación, se reporta el peso (Media  $\pm$  DE) de cada región encefálica estudiada:

Telencéfalo:  $0,209 \pm 0,030$  g

Cerebelo:  $0,038 \pm 0,010$  g

Diencéfalo:  $0,050 \pm 0,016$  g

Mesencéfalo:  $0,039 \pm 0,029$  g

Tallo encefálico:  $0,020 \pm 0,007$  g

### Tejido encefálico total

Al analizar la concentración de FT, PA y PL en el tejido encefálico completo, se registró una concentración de FT mayor en ratones machos tratados con LG e IP y menor con extracto de LG en hembras ( $p < 0,05$ ) con respecto al C (Figura 12). También se observó que la ingesta de los diferentes extractos de plantas estuvo asociada a efectos variables sobre el estado oxidativo del SNC en ambos sexos (Figura 13).

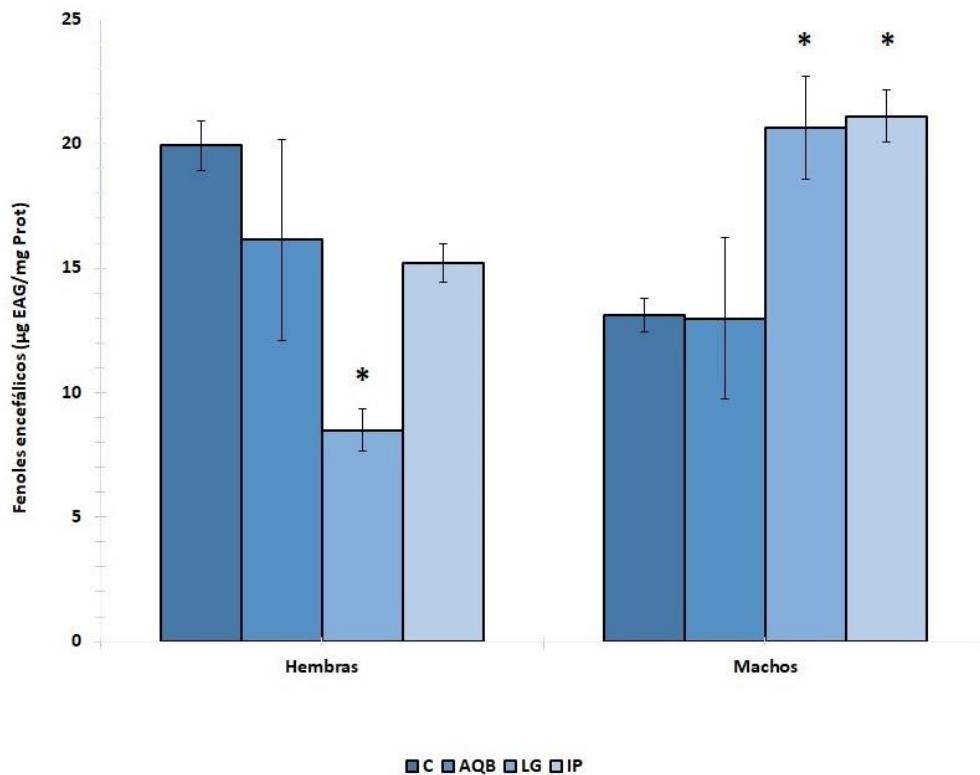


Figura 12. Fenoles totales encefálicos en ratones Balb/c sanos que recibieron tratamiento con fitoextractos. Dosis: 100 mg/Kg/día de extracto de LG, AQB o IP. C: control; LG: *Lantana grisebachii*; AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*; IP: *Ilex paraguariensis*. Resultados

expresados en  $\mu\text{g}$  de equivalente de ácido gálico/mg de proteínas ( $\mu\text{g}$  EAG/mg prot.). \*  $p < 0,05$ .

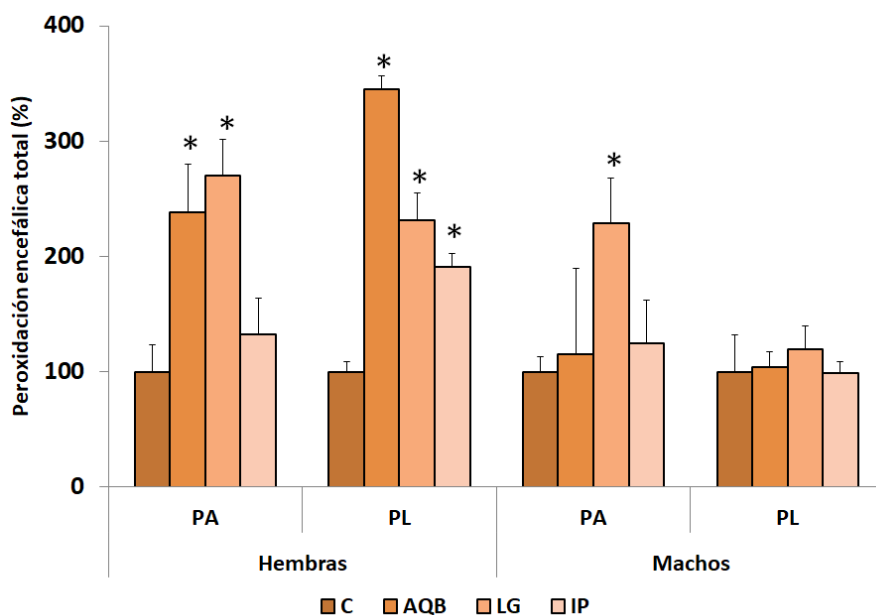


Figura 13. Peroxidación encefálica total en ratones Balb/c sanos que recibieron tratamientos con fitoextractos. Dosis: 100 mg/Kg/día de extracto de LG, AQB o IP. C: control; LG: *Lantana grisebachii*; AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*; IP: *Ilex paraguariensis*. PA: peróxidos acuosos; PL: peróxidos lipídicos. Resultados expresados en porcentaje (%) con respecto al grupo C. \*  $p < 0,05$ .

## Cerebro

### Telencéfalo

Los FT se incrementaron mediante los tratamientos de LG e IP (157 y 161%, respectivamente) ( $p < 0,05$ ) en machos, mientras que disminuyeron a 42% por LG en hembras ( $p < 0,05$ ) (Figura 14). PA se incrementaron mediante LG e IP (270% en ambos casos) en machos, y también en las hembras (aumento de 256%) ( $p < 0,05$ ). En machos, los PL se redujeron por el tratamiento de AQB (43% con respecto a los controles,  $p < 0,05$ ). En hembras, las determinaciones de SO aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en todos los tratamientos. Las concentraciones de GGT se elevaron sólo en los machos tratados con IP ( $0,30 \pm 0,04$ ) con respecto al grupo C ( $0,07 \pm 0,03$ ) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 5).

### **Diencéfalo**

Los niveles de FT se elevaron 11 veces en hembras tratadas con AQB ( $p < 0,05$ ) (Figura 14). En este grupo experimental, PA y PL aumentaron significativamente (500 y 1600%, respectivamente) ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, no se observaron modificaciones significativas con respecto a C de estos parámetros en machos con ningún tratamiento de fitoextracto. Las hembras tratadas con AQB mostraron una disminución de SO ( $p < 0,05$ ). Las determinaciones de GGT se redujeron en todos los tratamientos en hembras y fueron mayores debido a AQB en machos ( $1,12 \pm 0,00$ ) con respecto al grupo C ( $0,07 \pm 0,03$ ) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 5).

### **Mesencéfalo**

En ambos sexos, FT no se detectaron con los diferentes tratamientos, excepto por el extracto de AQB ( $p < 0,05$ ) (Figura 14). Los niveles de PA fueron elevados por todos los tratamientos: AQB, LG e IP (714, 952 y 476%, respectivamente) en hembras ( $p < 0,05$ ), mientras que solo el extracto de AQB incrementó la concentración de PA tres veces en machos ( $p < 0,05$ ). En ambos sexos, las concentraciones de LP fueron aumentadas por los tratamientos de AQB y LG (278% en machos y 313% en hembras, con cantidades similares con ambos extractos,  $p < 0,05$ ). Las concentraciones de SO disminuyeron por IP/LG y por AQB/LG en hembras y machos, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Solo las concentraciones de GGT en hembras disminuyeron por los extractos de LG e IP a niveles nulos ( $0,00 \pm 0,00$ ) con respecto al grupo C ( $0,07 \pm 0,02$ ) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 5).

### **Tallo encefálico**

La concentración de FT fue más alta en los tratamientos AQB y LG (1,8 y 2,5%, respectivamente,  $p < 0,05$ ) en relación a hembras y machos controles, respectivamente (Figura 14). PA fueron aumentados por LG (250 y 300% en hembras y machos,  $p < 0,05$ ) en ambos sexos, mientras que los niveles de PL fueron elevados por LG e IP (322 y 1240%, respectivamente,  $p < 0,05$ ) solo en hembras. SO disminuyó en hembras tratadas con LG y

aumentó en machos que recibieron el extracto de AQB ( $p < 0,05$ ). La actividad de GGT disminuyó por IP ( $0,04 \pm 0,01$ ) y LG ( $0,02 \pm 0,00$ ) con respecto al grupo de control ( $0,09 \pm 0,02$ ) en hembras y solo por IP ( $0,00 \pm 0,00$ ) con respecto al grupo C en machos ( $0,15 \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla 5).

### **Cerebelo**

Se observó una disminución de FT en machos tratados con AQB e IP en relación con el grupo C (48 y 36%, respectivamente,  $p < 0,05$ ; Figura 14). Además, los PA se incrementaron mediante el tratamiento con LG e IP (200 y 300%, respectivamente,  $p < 0,05$ ) en machos, aunque los efectos del extracto no fueron estadísticamente significativos en la concentración de PL con respecto a C. El anión SO no se afectó, mientras que la concentración de GGT aumentó con IP ( $0,14 \pm 0,05$ ) con respecto al grupo C ( $0,00 \pm 0,00$ ) en hembras ( $p < 0,05$ ; Tabla 5).

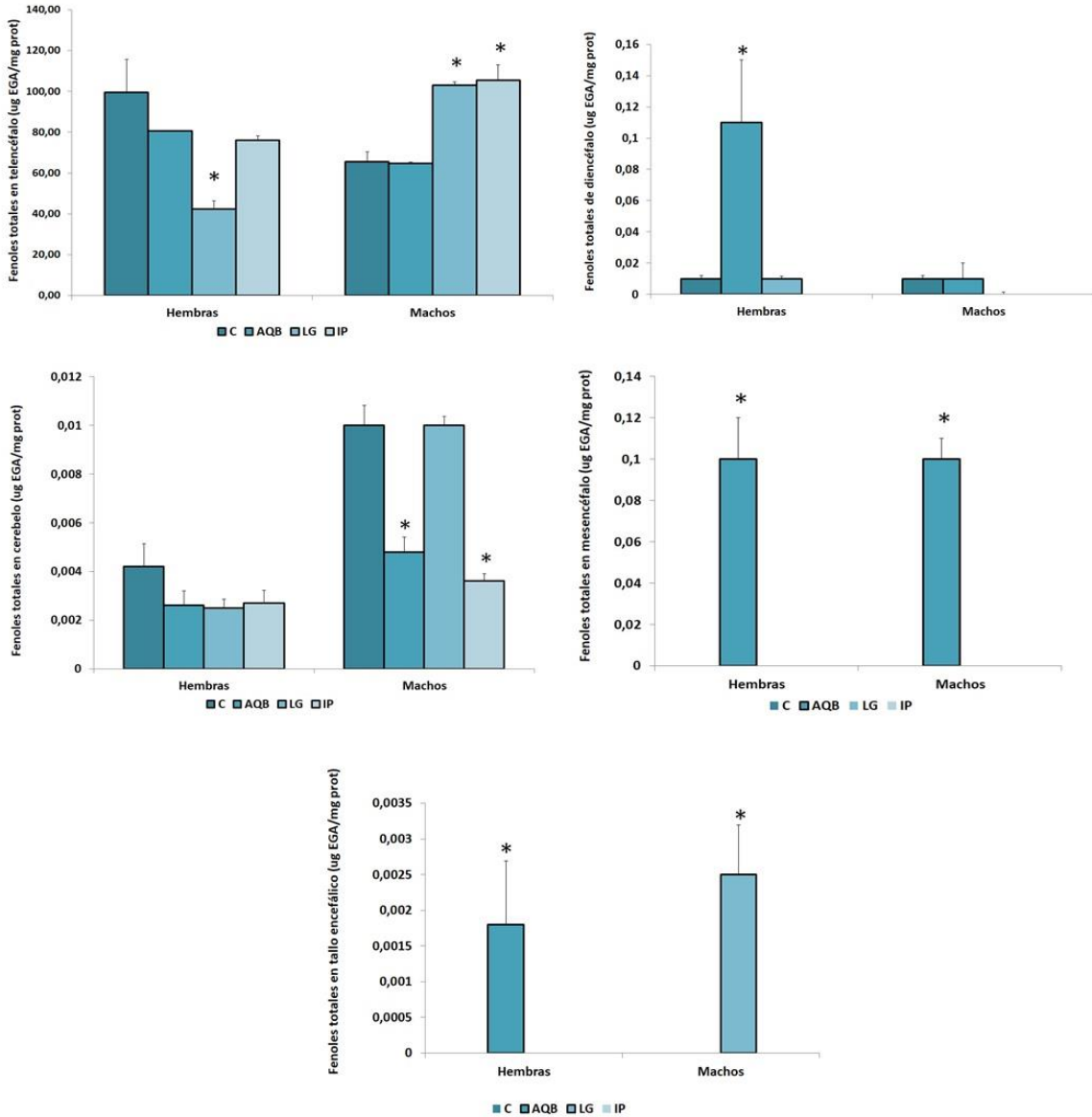


Figura 14. Concentración de fenoles totales en cada región cerebral estudiada de ratones Balb/c sanos de ambos sexos luego de la ingesta de extractos vegetales. C: control; LG: *Lantana grisebachii*; AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*; IP: *Ilex paraguariensis*. Resultados expresados en  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de proteínas ( $\mu\text{g}$  EAG/mg prot.).

Tabla 5. Biomarcadores redox en diferentes regiones encefálicas de ratones Balb/c sanos tratados con extractos vegetales

Tratamientos	Peróxidos acuosos (PA) (%)		Peróxidos lipídicos (PL) (%)		Anión Superóxido (SO) (%)		Actividad de enzima GGT (IU/mg)	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
<i>Telencéfalo</i>								
C	100,00±12,82	100,00±06,21	100,00±00,80	100,00±08,80	100,03±08,72	100,00±12,47	0,19±0,04	0,07±0,03
AQB	115,38±43,58	089,18±08,10	100,00±15,00	043,00±11,00*	175,89±06,95*	076,15±06,15	0,18±0,05	0,12±0,00
LG	256,41±12,81*	270,27±06,21*	100,00±13,00	100,00±13,00	137,96±05,29*	079,00±14,75	0,30±0,04	0,00±0,00
IP	256,41±35,89*	270,27±08,64*	100,00±05,00	100,00±05,80	177,28±21,47*	093,99±03,73	0,10±0,02	0,30±0,04*
<i>Diencefalo</i>								
C	100,00±04,20	100,00±15,00	100,00±18,80	100,00±50,00	099,97±05,39	100,00±04,94	2,11±0,93	0,07±0,03
AQB	500,00±100,0*	034,00±06,50	1600±400,00*	123,07±19,23	070,74±09,70*	090,65±09,35	0,00±0,00*	1,12±0,00*
LG	200,00±48,00	100,00±16,00	148,00±18,00	130,76±24,61	075,18±13,14	087,68±04,75	0,00±0,00*	0,25±0,04
IP	037,00±19,00	100,00±16,00	064,00±19,60	103,84±08,46	094,72±10,07	110,14±07,79	0,00±0,00*	0,29±0,20
<i>Mesencefalo</i>								
C	100,00±80,95	100,00±14,00	100,00±21,87	100,00±44,40	100,00±05,29	100,03±15,73	0,07±0,02	0,20±0,03
AQB	714,28±42,85*	300,00±22,00*	312,50±65,62*	277,77±36,11*	070,10±15,49	052,57±21,11*	0,09±0,01	0,17±0,00
LG	952,38±23,80*	200,00±25,00	312,50±75,00*	277,77±18,80*	069,76±09,99*	051,80±03,84*	0,01±0,01*	0,12±0,01
IP	476,19±97,61*	100,00±12,00	084,37±20,00	086,10±15,27	078,01±03,77*	081,73±03,66	0,00±0,00*	0,23±0,12
<i>Tallo encefálico</i>								
C	100,00±06,50	100,00±00,33	100,00±18,38	100,00±46,00	099,97±05,25	100,00±04,50	0,09±0,02	0,15±0,02
AQB	100,00±20,50	035,00±05,50	322,58±26,12*	100,00±01,00	106,53±03,26	106,53±03,26*	0,09±0,01	0,16±0,04

LG	250,00±50,00*	300,00±39,00*	1240,3±54,83*	100,00±39,00	077,16±01,80*	077,16±01,80	0,02±0,00*	0,09±0,02
IP	100,00±12,50	046,00±00,78	695,16±100,0	100,00±07,80	105,44±19,26	105,44±19,26	0,04±0,01*	0,00±0,00*
<i>Cerebelo</i>								
C	100,00±08,70	100,00±08,40	100,00±04,54	100,00±12,00	100,04±15,36	099,95±16,21	0,00±0,00	0,00±0,00
AQB	100,00±03,80	100,00±01,50	227,27±88,63	100,00±14,00	080,07±15,24	084,56±32,27	0,03±0,01	0,19±0,07
LG	100,00±06,40	300,00±28,00*	227,27±59,09	100,00±07,00	121,59±14,50	106,48±30,56	0,00±0,00	0,09±0,01
IP	100,00±18,00	200,00±32,00*	227,27±52,27	100,00±09,50	080,07±15,24	107,57±09,22	0,14±0,05*	0,07±0,01

Resultados (Media ± EE) expresados como porcentajes (%) del grupo control (PA, PL, SO) y como IU/mg (GGT). Tratamiento: 100 mg/Kg/Día de extractos. C: control; LG: *Lantana grisebachii*; AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*; IP: *Ilex paraguariensis*. \* p<0,05.



### **Perfil de AG encefálicos**

Los AG fueron analizados por cromatografía de gases, analizados agrupados en familias (Tabla 6; ver sección 2.2) e individualmente (Tabla 7).

Se hallaron pequeñas variaciones, sin significancia, en relación a los valores lipídicos hallados en el grupo C y aquellos que resultaron significativos fueron valores inferiores a C. En este sentido se halló una disminución de los AG saturados en el tratamiento con AQB e IP para ambos sexos, mientras que los valores registrados en hembras tratadas con LG fueron mayores y en machos similares al grupo C. Los AG  $\omega$ -3 aumentan en ratones de ambos sexos tratados con LG y AQB, mientras que disminuyó la concentración de estos AG en hembras tratadas con IP y aumentó en machos con este extracto. La cantidad de AG  $\omega$ -6, por otro lado, aumentó con los tratamientos de AQB e IP en hembras y disminuyó en aquellas tratadas con LG, mientras que en machos que recibieron AQB e IP aumentaron y con LG disminuyeron, en relación al grupo C. Los AG  $\omega$ -7 disminuyeron en ratones de ambos sexos tratados con LG y AQB, y aumentaron en hembras y marcadamente en machos tratados con IP en relación a la cantidad presente en el grupo C. Por último, las cantidades de AG  $\omega$ -9 disminuyeron en todos los ratones tratados con los extractos vegetales en relación al grupo C (Tabla 6).

En el análisis individual de cada AG identificado, se hallaron diferencias significativas en los AG: ácido  $\gamma$ -linolénico (18:3  $\omega$ -6) y ácido araquídico (20:0) en hembras tratadas con los cada fitoextractos y ácido linoleico (18:2) en machos tratados con IP en relación al grupo C ( $p < 0,05$ ).

A su vez, teniendo en cuenta el efecto de los fitoextractos en el ensayo *in vitro*, se observa una elevada concentración del ácido palmitoleico (16:1;  $\omega$ -7) en machos que recibieron IP (Norm. área 8,23 %) con respecto al grupo C (Norm. área 1,84 %), aunque no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (Tabla 7).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos de cerebro de ratones Balb/c tratados con extractos vegetales, agrupados en familias

	Hembras		Machos	
Control	Media	EE	Media	EE
AG saturados	28,52	1,73	31,58	2,69
AG $\omega$ -3	17,39	7,41	15,78	9,07
AG $\omega$ -6	20,31	0,52	20,87	1,08
AG $\omega$ -7	0,45	0,41	1,84	1,64
AG $\omega$ -9	17,14	0,21	16,92	1,92
LG				
AG saturados	35,82	2,86	28,46	1,83
AG $\omega$ -3	19,73	9,22	18,76	8,3
AG $\omega$ -6	8,45	2,73	22,03	0,7
AG $\omega$ -7	0,46	0,1	0,55	0,17
AG $\omega$ -9	14,01	3,38	14,77	2,1
AQB				
AG saturados	26,63	6,28	30,87	1,19
AG $\omega$ -3	19,68	10,94	19,87	12,63
AG $\omega$ -6	21,78	2,82	13,76	5,5
AG $\omega$ -7	0,39	0,24	0,17	0,03
AG $\omega$ -9	13,64	2,62	15,83	2,72
IP				
AG saturados	23,59	6,18	25,51	4,41
AG $\omega$ -3	15,48	6,33	20,49	12,02
AG $\omega$ -6	25,02	3,85	14,65	8,86
AG $\omega$ -7	0,79	0	8,23	7,88
AG $\omega$ -9	11,58	2,58	15,78	4,5

Resultados (Media  $\pm$  EE) agrupados en familias de AG, expresados en porcentaje (%). C: control; LG: *L. grisebachii*; AQB: *A. quebracho-blanco*; IP: *I. paraguariensis*.

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos de cerebro de ratones Balb/c tratados con extractos vegetales

AG	Control				LG				AQB				IP			
	Hembras		Machos		Hembras		Machos		Hembras		Machos		Hembras		Machos	
	Media	EE	Media	EE	Media	EE	Media	EE	Media	EE	Media	EE	Media	EE	Media	EE
14:0	0,31	0,10	0,06	0,01	0,11	0,01	0,13	0,00	0,27	0,13	0,43	0,13	0,13	0,02	0,40	0,14
14:1	0,36	0,16	0,14	0,07	0,13	0,00	0,10	0,00	0,20	0,16	0,68	0,48	0,48	0,17	3,22	3,05
16:0	17,05	1,01	18,17	0,11	21,47	0,83	17,85	0,51	15,76	2,67	18,20	0,35	17,29	1,00	15,77	1,93
16:1	0,45	0,41	1,84	1,64	0,46	0,10	0,55	0,17	0,39	0,24	0,17	0,03	0,79	0,00	8,23	7,88
18:0	10,05	0,48	10,78	1,24	11,31	0,48	8,49	0,24	7,16	1,03	8,86	0,47	5,13	4,89	7,16	0,89
18:1	11,78	0,02	11,16	0,36	11,60	1,34	10,05	1,79	9,18	0,12	12,70	0,02	9,23	0,72	8,25	2,92
18:2	4,97	0,00	4,72	0,11	0,71	0,64	5,14	0,05	5,35	0,53	4,87	0,07	7,88	3,35	4,22*	0,1
18:3n3	1,94	0,11	1,05	1,00	1,44*	0,17	2,12	0,00	1,55*	1,46	1,07	0,99	2,08*	0,01	2,17	0,00
18:3n6	0,02	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	1,12	0,00	0,00	0,00	0,46	0,19	0,00	0,00
20:0	0,05	0,00	0,10	0,05	0,00*	0,00	0,99	0,94	0,00*	0,00	1,89	0,00	0,00*	0,00	0,00	0,00
20:1	0,00	0,00	1,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20:1n9	0,44	0,32	0,96	0,00	0,98	0,59	0,86	0,14	3,81	1,98	1,10	0,11	1,09	0,32	1,28	0,21
20:2	0,08	0,01	0,05	0,00	0,52	0,36	0,58	0,00	0,59	0,47	0,29	0,00	1,21	0,00	1,26	1,18
20:3n3	3,93	0,04	2,94	0,64	5,27	0,00	4,22	0,32	4,66	1,51	8,66	5,52	2,71	0,17	8,35	6,22
20:4n6	15,24	0,51	16,1	0,97	7,14	1,73	16,31	0,65	14,72	1,82	8,60	5,43	15,47	0,31	9,17	7,58
20:5n3	3,82	0,06	4,03	0,11	3,96	0,31	4,08	0,09	6,91	1,97	3,85	0,07	4,46	0,18	3,92	0,76
22:1n9	0,12	0,00	0,04	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	1,92	0,00	0,00	0,00	0,11	0,01	0,63	0,00
22:2	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:5	3,66	3,57	3,68	3,65	3,93	3,88	3,73	3,62	3,23	2,70	2,96	2,88	2,96	2,88	3,32	2,74
22:6	4,04	3,63	4,08	3,67	5,13	4,86	4,61	4,27	3,33	3,30	3,33	3,17	3,27	3,09	2,73	2,30
24:0	1,06	0,14	2,47	1,28	2,93	1,54	1,00	0,14	3,44	2,45	1,49	0,24	1,04	0,27	2,18	1,45
24:1	5,24	0,19	3,83	1,56	2,08	2,04	4,72	0,31	2,54	2,50	3,13	2,70	2,24	1,85	6,90	1,58

Resultados (Media ± EE) expresados como porcentajes (%) de Norm. de Área. C: control; LG: *L. grisebachii*; AQB: *A. quebracho-blanco*; IP: *I. paraguariensis* (\*p<0,05).

### 3.5. Bioactividad *in vivo* del extracto de *Ilex paraguariensis* en un modelo oncológico

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* con ratones sanos, se realizó el ensayo 2 (ver sección 2.3). Para conocer el efecto neuroinmune del consumo de IP en ratones inoculados con LAC-1 (cáncer de pulmón), se determinaron FT y PL en cerebro (telencéfalo y diencefalo), la presencia de compuestos fenólicos por HPLC-UV, la concentración de IL-6 y de TNF $\alpha$  en cerebro y, por último, se analizó la histología de telencéfalo de ratones tratados con IP y del grupo C.

#### Determinación de compuestos bioactivos y marcadores redox

##### Fenoles totales

En telencéfalo y diencefalo, ambos tratamientos con IP aumentan la concentración de FT en relación al C, sin ser diferencias estadísticamente significativas (Figura 15).

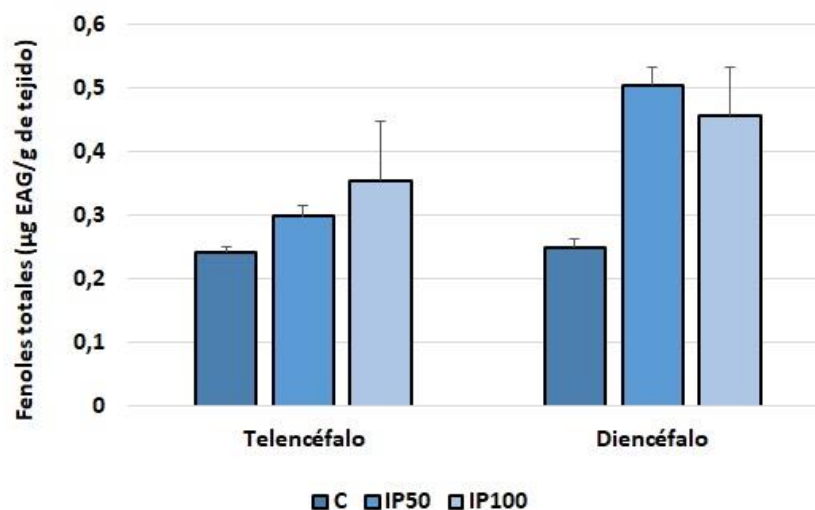


Figura 15. Fenoles totales en telencéfalo y diencefalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón que recibieron por vía oral extracto de *Ilex paraguariensis*. Fenoles totales expresados en  $\mu\text{g EAG/g}$  de tejido. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. \*  $p < 0,05$ .

##### Peróxidos lipídicos

No se observaron variaciones considerables en cerebro en relación al grupo C (Figura 16).

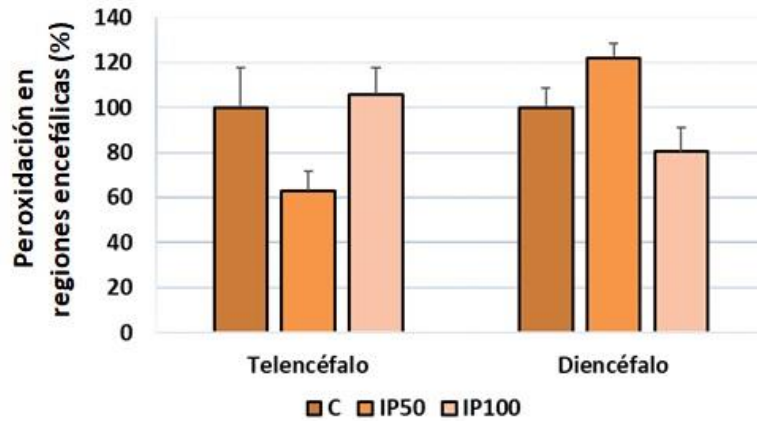


Figura 16. Peróxidos lipídicos en telencéfalo y diencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón que recibieron por vía oral extracto de *Ilex paraguariensis*. Peróxidos lipídicos expresados en porcentaje (%) en relación al grupo control. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. \*  $p < 0,05$ .

#### Concentración de IL-6 y TNF $\alpha$

En telencéfalo, la concentración de IL-6 disminuyó en IP50 (30%) y aumentó en IP100 (23%) con respecto al C ( $p < 0,05$ ). En diencéfalo, tanto IP50 como IP100 dieron como resultado concentraciones de IL-6 menores al grupo C (9% y 29%, respectivamente,  $p < 0,05$ ), revelándose una respuesta dependiente de la dosis (Figura 17). Por otro lado, las concentraciones de IL-6 en sangre de ratones tratados con IP fueron menores, pero sin ser estadísticamente significativa con respecto al grupo C (Figura 18).

Por último, la concentración de FNT $\alpha$  fue menor en cerebro de ratones tratados con IP, sin significancia con respecto al C (Figura 19).

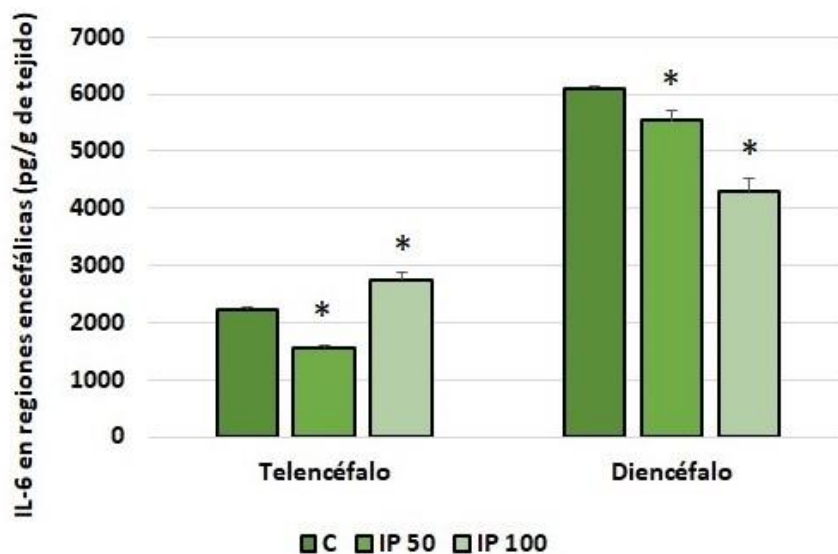


Figura 17. Concentración de IL-6 en cerebro de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con *Ilex paraguariensis*. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. Resultados expresados en pg/g de tejido. \* $p < 0,05$ .

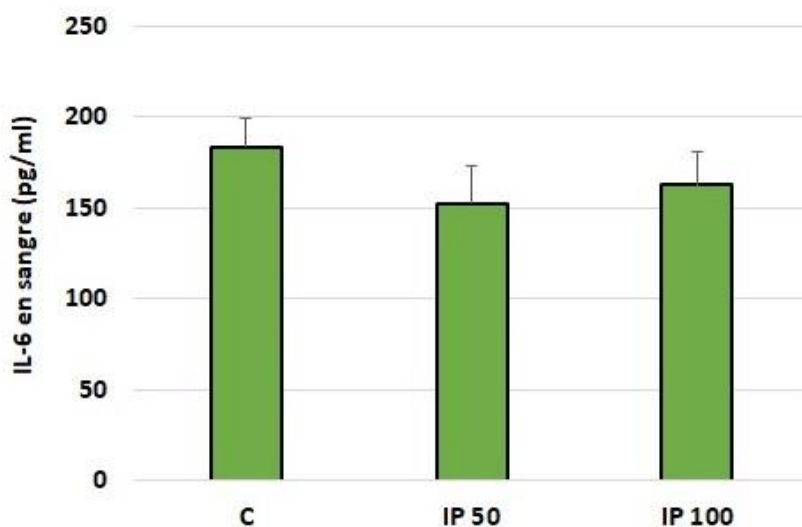


Figura 18. Concentración de IL-6 en sangre de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con *Ilex paraguariensis*. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. Resultados expresados en pg/ml.

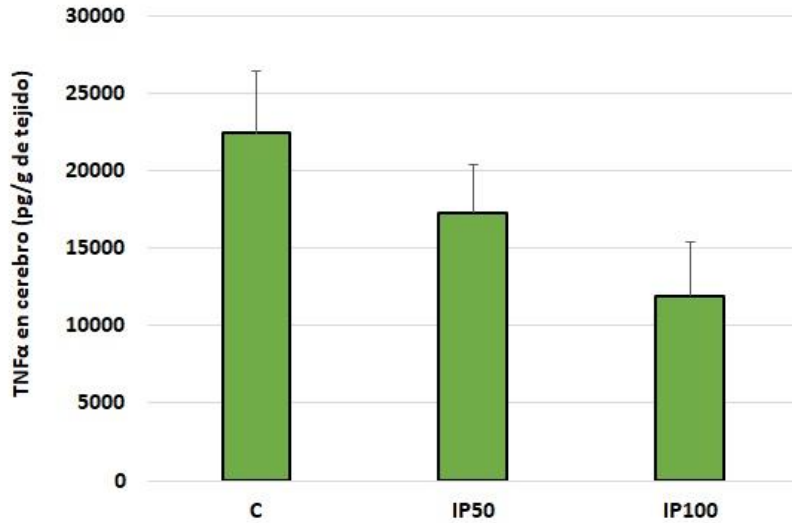


Figura 19. Concentración de TNF $\alpha$  en cerebro de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con *Ilex paraguariensis*. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. Resultados expresados en pg/g de tejido.

### Histología cerebral

El análisis macroscópico del cerebro fue normal. No se identificaron células metastásicas.

El análisis histológico de cortes de telencéfalo teñidos por el método Klüver Barrera, reveló fibras de proyección de materia blanca dentro de este órgano con diferentes grados de mielinización entre los grupos experimentales. El grupo IP50 e IP100 mostraron mayor cantidad de mielina teñida con *luxol* en relación al grupo C ( $p < 0,05$ ). Además, el cerebro del grupo C mostró un bajo contraste de tinción entre la materia gris y blanca, en concordancia con la desmielinización (Figura 20 y 21). A su vez, las microfotografías muestran una mejora en la tinción y la citología de *violeta de cresilo* al aumentar las dosis de IP (indicado con rectángulo), mientras que la retracción celular se encuentra en ausencia de tratamiento: grupo control (indicado con óvalo) (Figura 21).

Por otro lado, cortes de telencéfalo fueron teñidos con Hematoxilina/Eosina (H/E) y varios campos microscópicos de la materia gris del cerebro se evaluaron a 400X. Se encontró un número creciente de células en ratones tratados con IP50 e IP100 con respecto al C ( $p < 0,05$ )

(Figura 22). Además, los ratones con ambos tratamientos, pero principalmente IP100, presentaron mejores características citológicas neuronales en cerebros teñidos (Figura 23). Por otro lado, las microfotografías muestran una disminución progresiva del porcentaje (%) de células picnóticas con respecto a las células totales al aumentar las dosis de IP (indicadas con flechas, Figura 24).

Por último, los hallazgos se asociaron con menos células apoptóticas en ratones tratados con ambas dosis de IP (C = 100%, IP50 = 79% e IP100 = 83%) (Figura 25), caracterizadas por núcleos condensados en cerebros teñidos con Hoechst (Figura 26).

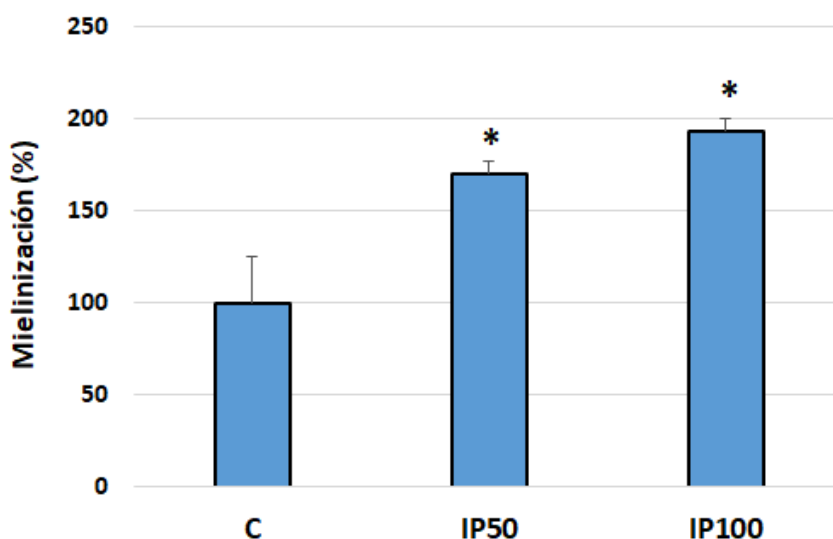


Figura 20. Mielinización en telencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con *Ilex paraguariensis*. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. Resultados expresados en porcentaje (%) con respecto al grupo control. \*p<0,05.



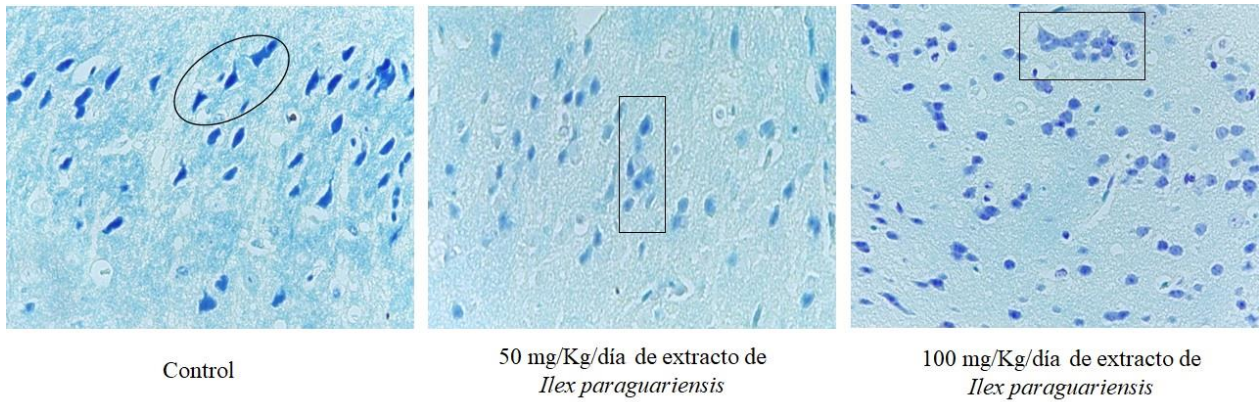


Figura 21. Neuronas de la corteza, teñidas con método Klüver Barrera (violeta de cresilo/luxol fast blue) a 400X, de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral durante 21 días con 50 o 100 mg/kg/día de extracto de *Ilex paraguariensis* y grupo control sin tratamiento.

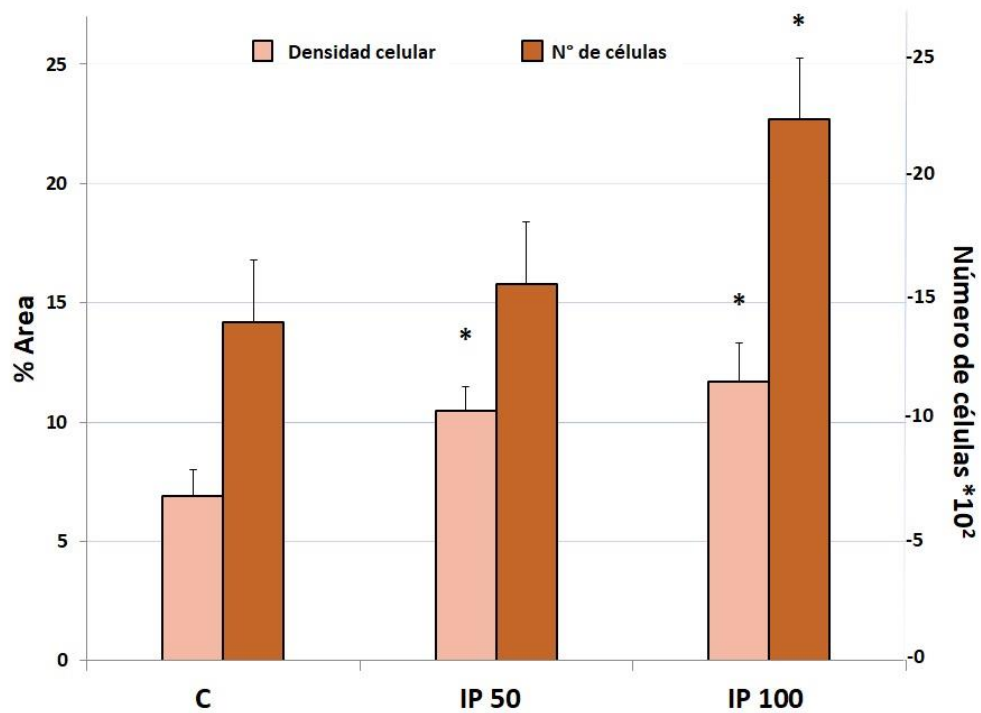


Figura 22. Número de células y porcentaje de área en telencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con *Ilex paraguariensis*. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. \*p<0,05.

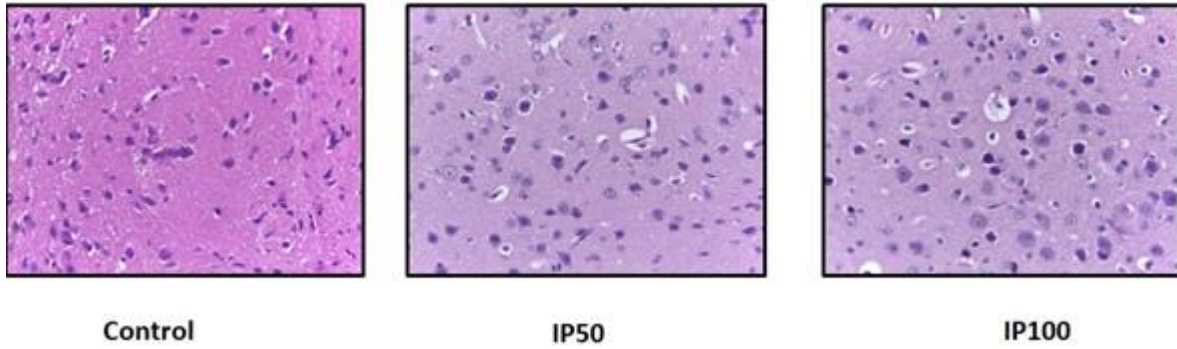


Figura 23. Células de materia gris de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados con extracto de *Ilex paraguariensis*. C: control; IP 50: 50 mg/Kg/día de IP; IP 100: 100 mg/kg/día de IP. Microfotografías representativas con tinción H/E a 400X. Media  $\pm$  EE, cuantificada usando el software Fiji ImageJ v 1.51.

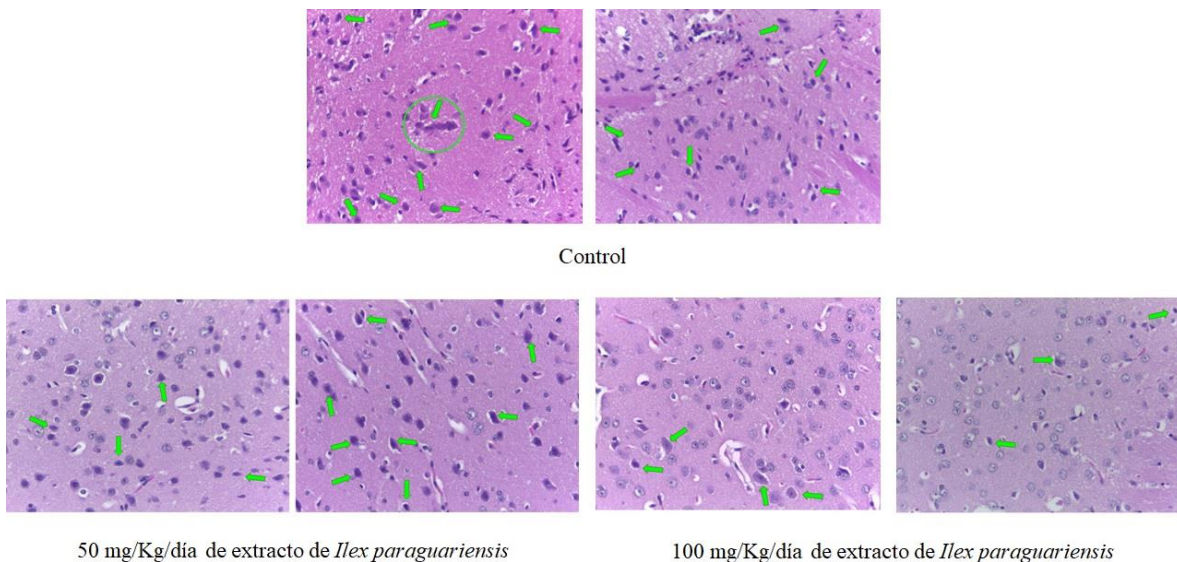


Figura 24. Células picnóticas en la corteza teñidas con H/E. Analizadas a 400x de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral durante 21 días con 50 o 100 mg/Kg/día de extracto de *Ilex paraguariensis* y grupo control sin tratamiento. Picnosis identificada con flechas.

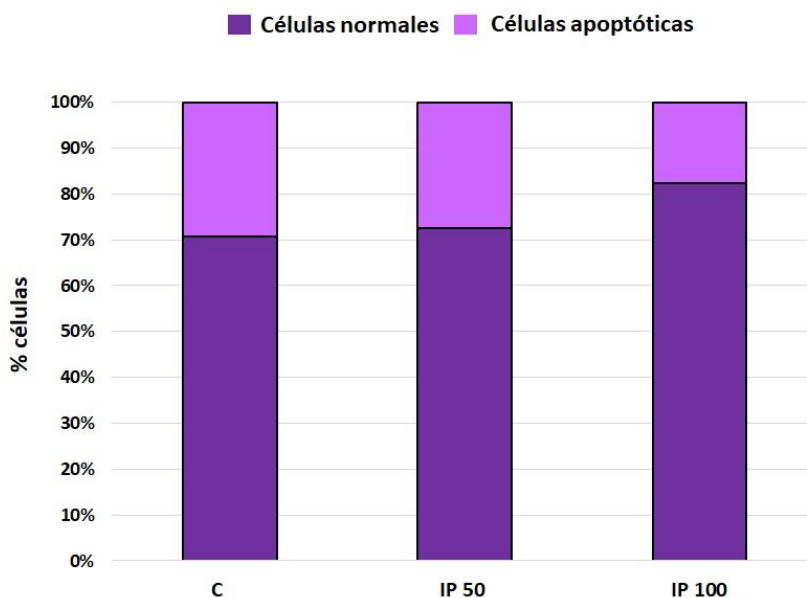


Figura 25. Número de células y porcentaje de área en telencéfalo de ratones Balb/c con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con *Ilex paraguariensis*. C: control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/Kg/día de IP. \* $p < 0,05$ .

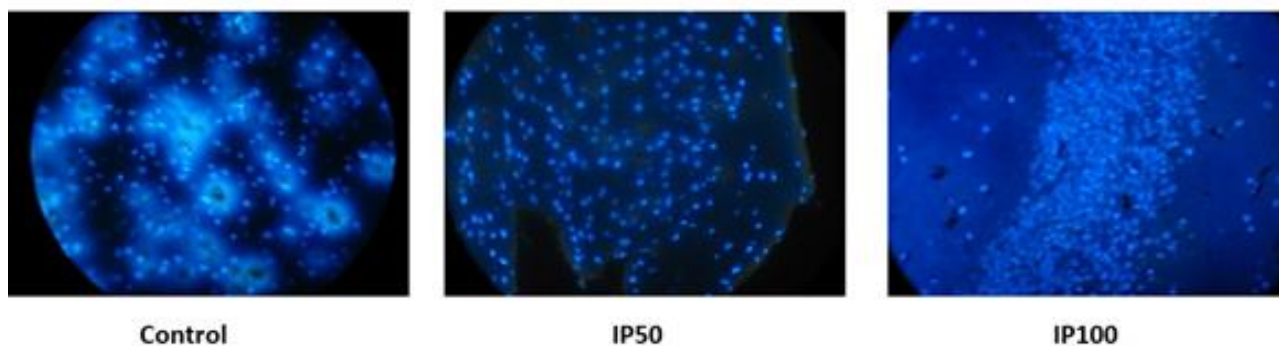


Figura 26. Microfotografías representativas de telencéfalo en ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados con extracto de *Ilex paraguariensis*. C: control; IP 50: 50 mg/Kg/día de IP; IP 100: 100 mg/kg/día de IP. Microfotografías representativas con tinción de Hoechst a 400X. Resultados expresados en porcentajes (%) con respecto al grupo C. Media  $\pm$  EE, cuantificada usando el software Fiji ImageJ v 1.51.

### 3.6. Fitoquímica de cerebros analizados por HPLC

En la Figura 24 se observan los tiempos de retención de los estándares utilizados para identificar compuestos fenólicos en tejido cerebral de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral durante 21 días con ambas dosis de *Ilex paraguariensis*. También se analizó hígado (principal órgano metabólico de fenoles) y tumor, para conocer la distribución y biodisponibilidad de estos compuestos en los tejidos. Los compuestos fenólicos identificados en cerebro (telencéfalo y diencéfalo) fueron ácido clorogénico (AC) y quercetina (QC), detectados a los 7,17 y 29,28 minutos, respectivamente (Figuras 27, 28 y Tabla 8) (Anexo 2). Otros compuestos fenólicos, como ácido gálico, cumárico, cafeico y ferúlico, no se incluyeron en resultados ya que se detectaron en cantidades trazas.

El tratamiento con IP50 dio como resultado un aumento significativo de AC en telencéfalo, diencéfalo y tumor, mientras que no se detectó QC. Después del tratamiento con IP100, AC aumentó aún más en telencéfalo, diencéfalo, tumor e hígado ( $p < 0,05$ ) y los niveles QC aumentaron en el diencéfalo y en hígado. No se detectaron compuestos en el grupo de C (Tabla 8).

Los ratones portadores de LAC-1 mostraron concentraciones IP dependientes de la dosis de ambos compuestos fenólicos en los sitios estudiados, donde la concentración de AC fue más alta que la concentración de QC. Además, el AC exhibió una distribución tisular diferencial con una mayor concentración principalmente en el telencéfalo, pero también en el diencéfalo, el hígado y el tumor, mientras que la QC se distribuyó principalmente en el diencéfalo (tabla 8).

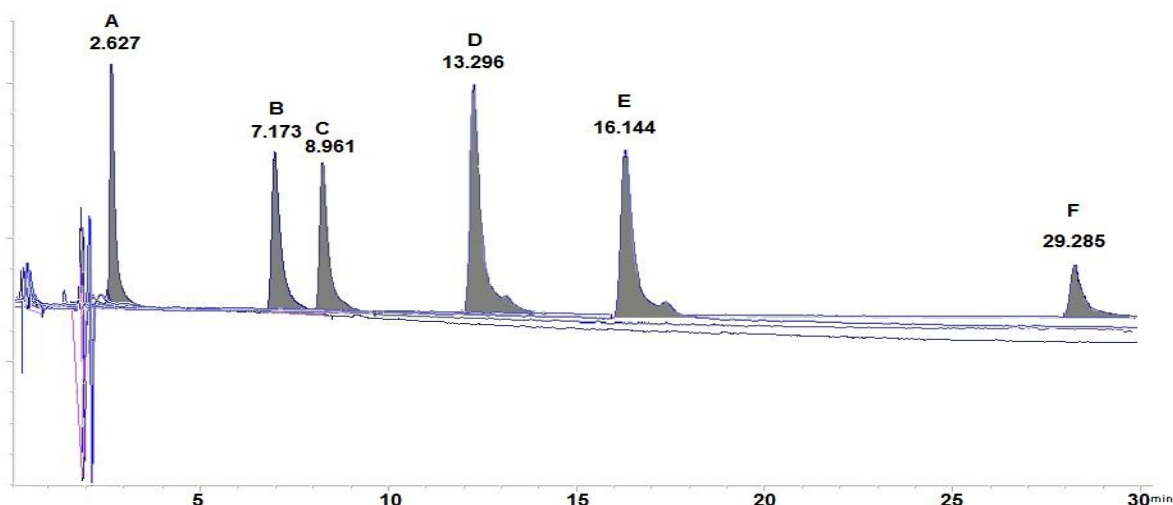


Figura 27. Estándares puros utilizados para identificar y cuantificar compuestos fenólicos en tejidos murinos. A: ácido gálico; B: ácido clorogénico; C: ácido cafeico; D: ácido cumárico; E: ácido ferúlico; F: quercetina. Espectro UV: 260, 280, 306, 320 nm.

Tabla 8. Compuestos fenólicos identificados en tejidos de ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón tratados por vía oral con extracto de *Ilex paraguariensis*.

	Ácido clorogénico (280 nm HPLC-UV)	Quercetina (320 nm HPLC-UV)
<b>Telencéfalo</b>		
Control	Nd	Nd
IP50	0,22±0,11*	Nd
IP100	1,01±0,15*	Nd
<b>Diencéfalo</b>		
Control	Nd	Nd
IP50	0,07±0,00*	Nd
IP100	0,24±0,00*	0,02±0,00*
<b>Hígado</b>		
Control	Nd	Nd
IP50	Nd	Nd
IP100	0,09±0,05	0,01±0,01
<b>Tumor</b>		
Control	Nd	Nd
IP50	0,05±0,02	Nd
IP100	0,20±0,03*	Nd

C: Control; IP50: 50 mg/Kg/día de IP; IP100: 100 mg/kg/día de IP. Nd: no detectado; \*p<0.05.

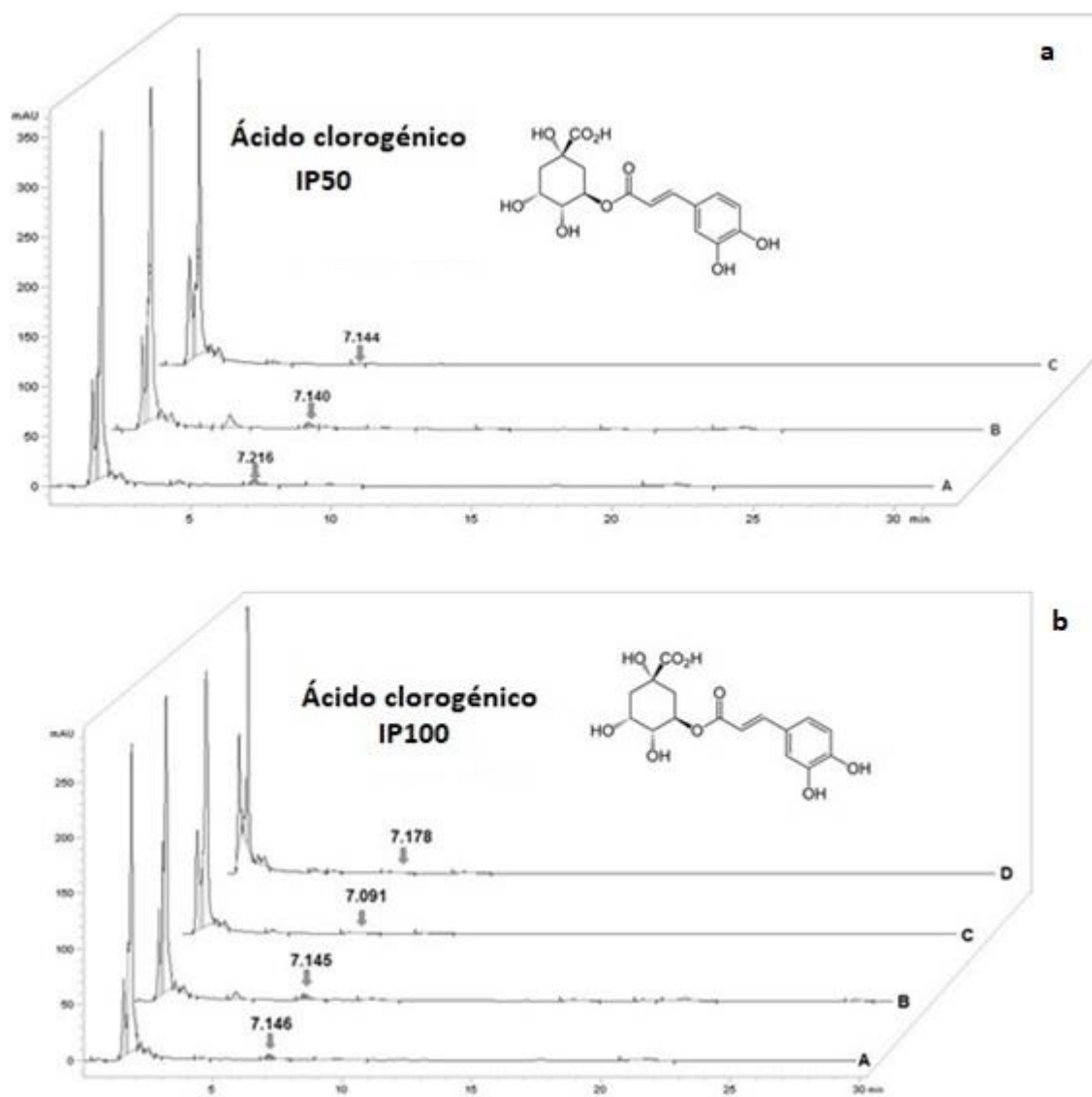


Figura 28. Ácido clorogénico (Rt  $\approx$  7,17 min, HPLC-UV 280 nm) en ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón. Telencéfalo (A), diencefalo (B), tumor (C) e hígado (D) tratados por vía oral con extracto de IP. Figura a: IP50 (50 mg/Kg/día de IP); Figura b: IP100 (100 mg/Kg/día de IP).

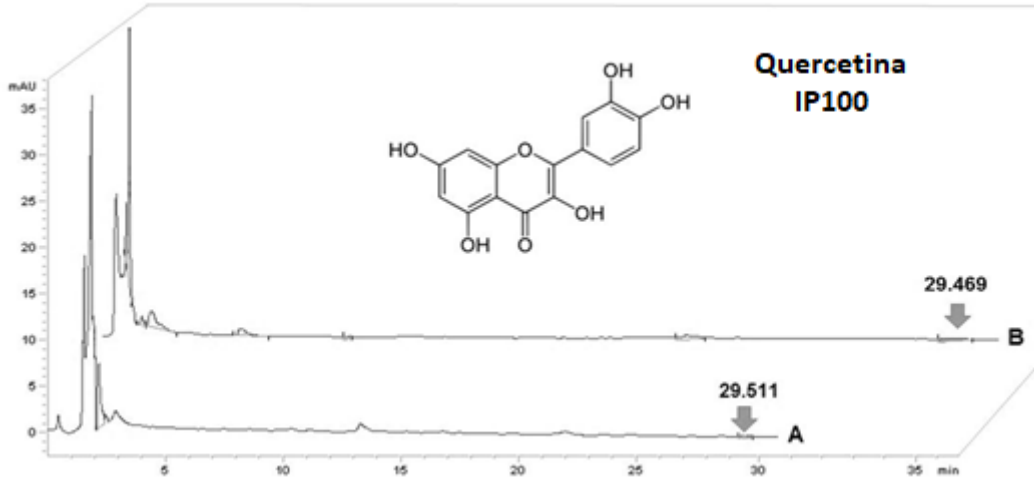


Figura 29. Quercetina ( $R_t \approx 29,28$  min, HPLC-UV 320 nm) en ratones Balb/c machos con adenocarcinoma de pulmón. Diencéfalo (A) e Hígado (B) tratados por vía oral con extracto de IP. IP 100: 100 mg/Kg/día de IP. A: diencéfalo; B: hígado.

## Capítulo 4 Discusión

Los distintos objetivos de esta tesis doctoral respondieron a la hipótesis planteada acerca de la capacidad neuroprotectora de los extractos de plantas autóctonas ingeridos en forma de infusión en ratones. Los principales fitoquímicos estudiados fueron los polifenoles, ya que numerosos estudios avalan su acción neuroprotectora en distintos diseños experimentales *in vitro* e *in vivo* (Vauzour, 2012; Spencer et al, 2008).

En primer lugar, se estudió y caracterizó cada planta seleccionada para conocer su composición fenólica por HPLC-DAD-MS. Se identificaron numerosos compuestos fenólicos en extractos de tres plantas sudamericanas: *Lantana Grisebachii* (LG), *Aspidosperma quebracho blanco* (AQB) e *Ilex paraguariensis* (IP). Tratamientos de distintas dosis de extractos se analizaron en cultivos de dos líneas celulares (C6 murino y T98-G humano). Estas células se eligieron dado que la glía juega un papel clave en la neuroinflamación mediada por IL-6, que está implicada en la respuesta al glioma (Ferrerres et al, 2014).

En cuanto a la composición fitoquímica, se identificaron veintiún (21) compuestos en LG, donde cerca del cincuenta por ciento (50%) fueron identificados como iridoides, principalmente tevesido y dihidrotevesido. Los iridoides agrupan una serie de monoterpenos bicíclicos (C10) derivados biosintéticamente del monoterpeno geraniol que se encuentran generalmente en forma de heterósidos, y mayoritariamente como glucósidos, reconocidos por su actividad antitumoral y antiinflamatoria (López-Carreras et al, 2012). Además, el extracto fue una fuente de derivados geniposídicos, que se han descrito en diferentes familias taxonómicas (Xu et al, 2014). La detección de isómeros de verbascósidos, otro compuesto principal de LG, ya fue descrito en el perfil fitoquímico de la familia Verbenaceae (Julião et al, 2010). De este modo, la caracterización realizada permitió profundizar el conocimiento del género, dado que la literatura científica a menudo hace referencia a los lantadenos, principales compuestos de *Lantana camara p.* (Grace-Lynn et al, 2012). En cuanto al efecto hallado de este extracto sobre las líneas celulares, los compuestos de LG no modificaron la liberación de IL-6. Sin embargo, se ha reportado que algunos iridoides reducen las respuestas inflamatorias (Park et al, 2010). No obstante, se



relacionaron positivamente con el contenido celular de ácidos grasos poliinsaturados. No se hallaron estudios científicos que muestren el efecto de este extracto sobre el perfil de ácidos grasos.

Por otro lado, treinta y uno (31) fueron los compuestos identificados en AQB, los cuales fueron mayoritariamente derivados del ácido hidroxibenzoico, principalmente gentisoil-dihexósido y gentisoil-hexósido. También se determinaron diferentes flavonoides, como isorhamnetina-glicósido y derivados del ácido cafeoil-quinico como 1-cafeoil-quinico. Estos resultados son originales ya que las investigaciones previas generalmente se centraron en los alcaloides de este tipo de plantas (Layne et al, 2015). Se identificó el ácido gálico, ampliamente distribuido en Plantae y, el principal aporte fue la identificación de otros compuestos menos frecuentes como el ácido trihidroxiftálico, identificados anteriormente en otras familias de plantas (Barrajón-Catalán et al, 2011; Ezuruike et al, 2014). Por lo tanto, el perfil fitoquímico de AQB se amplió con este trabajo. Otros compuestos identificados en menor cantidad estaban de acuerdo con el perfil fitoquímico de Apocynaceae (Ezuruike et al, 2014), uno de ellos fue la isorhamnetina. Este compuesto exhibe potencial antiinflamatorio (Antunes-Ricardo et al, 2015), sin embargo, este extracto promovió la liberación de IL-6 en nuestro trabajo. Por otro lado, no hay antecedentes bibliográficos en cuanto al papel de los principales compuestos AQB en la neuroinflamación.

En el caso de IP, la infusión mostró mayor concentración de polifenoles totales por litro de infusión, en relación a las otras dos plantas estudiadas (IP > LG > AQB). IP presentó veintitrés (23) compuestos identificables, incluidos varios derivados de ácido cafeoil-quinico. Aunque las moléculas de esta planta se han identificado previamente (Bracesco et al, 2011; Puangpraphant et al, 2011), el trabajo actual encontró un contenido notable de ácido clorogénico (≈24% del total de compuestos fenólicos identificados). La reducción de la liberación de IL-6 después de la exposición a estos ácidos fenólicos (en sus formas: 1-cafeoil-quinico, 5-cafeoil-quinico y 1,3-cafeoil-quinico) fue de acuerdo con su actividad antiinflamatoria reportada en otros estudios (Puangpraphant et al, 2011; Vera et al, 2013). A su vez, los efectos de los compuestos de IP se asociaron principalmente con el aumento de la familia de grasas ω-7, representada por el ácido palmitoleico. Por lo tanto, confirmó

el efecto antiinflamatorio de este ácido graso sobre las células gliales, incluida la reducción de IL-6 y otros mediadores inflamatorios que se encuentran en otras células (Chan et al, 2015; Macrae et al, 2013). Esto indicó un papel regulador de los ácidos fenólicos sobre el metabolismo de los lípidos gliales (es decir, el ácido clorogénico podría regular por incremento de la esteroil-CoA desaturasa, que cataliza la conversión de ácidos grasos saturados en monoinsaturados). Esto proporciona una nueva percepción de un ácido graso poco conocido y su papel como objetivo de los agentes neuroinmunomoduladores. Además, el ácido palmitoleico, AG de la familia  $\omega$ -7, se halló notablemente potenciado en el cerebro murino por la infusión IP (Levin et al, 2017; Suzuki et al, 2012).

Por último, en cuanto a la viabilidad celular, las tres dosis empleadas (50, 100 y 200  $\mu$ g/mL) de los extractos estudiados (LG, AQB e IP) resultaron citoprotectores de las células tumorales humanas de glioblastoma T98-G. Del mismo modo, estudios realizados con otros extractos mostraron el mismo efecto protector sobre células del SNC (Zamin et al, 2013; Abib et al, 2010).

Para el estudio del efecto neuroprotector de los fitoextractos, se realizó un ensayo *in vivo* con ratones Balb/c sanos de ambos sexos, luego de la ingesta de infusión de LG, AQB o IP en una única dosis de 100 mg/Kg/día y un grupo control (C) que recibió agua sin tratamiento. Se determinaron biomarcadores redox como fenoles totales, peroxidación y la enzima GGT. Se determinó el perfil lipídico, dada la susceptibilidad del tejido nervioso a lipoperoxidación. Se hallaron grandes variaciones en el estado redox de las distintas regiones encefálicas estudiadas de ratones que consumieron durante 30 días estas infusiones. Las regiones encefálicas fueron cerebro (telencéfalo y diencefalo), mesencéfalo, cerebelo y tallo encefálico. En primer lugar, los resultados arrojados tras el consumo de IP muestran una cadena de reacciones que comienza con valores elevados de superóxido (SO) actuando como precursor de peróxidos acuosos y lipídicos observados en cerebelo y cerebro de ratones de ambos sexos, afectando en menor medida el telencéfalo, y previniendo así esta oxidación a nivel subcortical. Esta susceptibilidad redox de la corteza cerebral ya ha sido estudiada previamente en otras investigaciones con fitoextractos (Haque et al, 2007). También, la actividad de GGT respondió a estos cambios confirmando

la respuesta al estrés celular (Quiroga et al, 2010). Por otro lado, se halló una concentración de fenoles totales elevada en el telencéfalo de machos. Esto puede ser debido a su biodisponibilidad sistémica (Canalis et al, 2014), lo cual favorece su pasaje a través de la barrera hematoencefálica (Vauzour et al, 2010; Vasilopoulou et al, 2013). Esto es avalado por otros estudios que demuestran la capacidad de los fenoles derivados de infusiones de alojarse en el SNC luego de su ingesta oral (Andrade et al, 2012). Así, los compuestos presentes en IP, podrían resultar excitantes de la barrera hematoencefálica, principalmente en machos, donde se observó mayor concentración de fenoles totales encefálicos con este extracto y mejor distribución cuando se analizaron las regiones individualmente (telencéfalo, tallo encefálico y cerebelo).

También la diferencia en la concentración de fenoles asociada al sexo se observó en telencéfalo y tallo encefálico de los ratones tratados con LG mostrando un desbalance en ambos casos: siendo deficientes en hembras y acumulados en machos, lo cual podría causar en ambos casos las alteraciones redox (Samsel et al, 2013). Dado que la biodisponibilidad oral y el perfil fitoquímico fueron los mismos para ambos sexos, se infirió que los procesos de transporte activo se diferenciaban entre machos (afluencia) y hembras (flujo de salida), sin conocerse los mecanismos específicos. Sin embargo, la inhibición de la GGT encefálica en las hembras podría estar involucrada. Esta enzima es un marcador estructural y funcional de la barrera hematoencefálica (Kido et al, 2010; Vandenhoute et al, 2011) ya que promueve la permeabilidad de la barrera y los flujos de agua (Welbourne et al, 1982), clave para los compuestos derivados de infusiones. Así, su menor actividad catalítica, generalmente observada en hembras, podría explicar la menor concentración de fenoles encontrados. Además, se conoce que el consumo de LG promueve la inhibición de GGT en ratas (Ramos Elizagaray, 2013). En conclusión, la ingesta del extracto de esta planta fue asociada con un estado oxidativo general del SNC, lo cual es coincidente con resultados previos (Ramos Elizagaray, 2013).

El tratamiento con AQB indujo una redistribución fenólica en encéfalo de hembras que se refleja en aumentos subcorticales (cerebro, mesencéfalo y tallo encefálico), lo cual estuvo relacionado con la producción de peróxidos (Samsel et al, 2013). Por otra parte, las hembras

mostraron un efecto oxidante residual en telencéfalo, mientras que los machos respondieron a este extracto, en menor medida, con desequilibrio redox sólo mesencefálico. Las características farmacocinéticas de los fenoles relacionadas con el sexo pueden explicar su aumento en encéfalo femenino con respecto a los machos (Li et al, 2012).

Dada la composición lipídica del tejido encefálico, las modificaciones oxidativas de los lípidos causadas por las especies reactivas de oxígeno juegan un rol fundamental en las patologías crónicas como las neurodegenerativas y neuroinflamatorias. En este sentido, en las regiones encefálicas de ratones tratados con los fitoextractos se hallaron pequeñas variaciones sin significancia en relación a los valores lipídicos hallados en el grupo C, siendo IP el fitoextracto que mostró mayor concentración de AG anti-inflamatorios. Estos resultados fueron registrados en el ensayo *in vitro* realizado (Cittadini et al, 2018) y avalado por otros estudios *in vivo* donde sugieren que tratamientos con IP conservan la concentración de AG insaturados y los protege de la oxidación, principalmente a nivel hepático (Martins et al, 2009).

A partir de los resultados obtenidos, se realizó un segundo ensayo *in vivo*, con ratones Balb/c machos que fueron inoculados con células LAC-1 de adenocarcinoma de pulmón y tratados durante 21 días con extracto de IP (dosis 50 o 100 mg/Kg/día) por vía oral. Los resultados alcanzados muestran las variaciones de parámetros oxidativos e inflamatorios en las regiones encefálicas de ratones tratados en comparación a aquellos que no recibieron tratamiento (grupo control).

Al igual que el ensayo anterior, se observan fenoles totales aumentados en telencéfalo de ratones tratados con IP, que se debe a su biodisponibilidad sistémica (Canalis et al, 2014), avalado por la respuesta lipofílica de los fenoles para atravesar la barrera hematoencefálica (Vauzour et al, 2010; Vasilopoulou et al, 2013). Estos valores se observan también en diencefalo, principalmente con las dosis mayores de tratamiento administradas, resultados avalados por Andrade et al, que describe la capacidad de los compuestos fenólicos de llegar al cerebro luego de la ingesta oral (Andrade et al, 2012).

Por otra parte, se observaron variaciones en las concentraciones de peróxidos lipídicos en telencéfalo y diencéfalo con respecto al C. Estos resultados, asociados a la concentración de fenoles observadas en las regiones encefálicas, no responden a la acción antioxidante de estos compuestos que se observó en ensayos *in vivo* con ratones sanos (Cittadini et al, 2015), donde los fenoles actuaron como compuestos preventivos de procesos oxidativos a nivel subcortical (Carmo et al, 2013; González de Mejía et al, 2010; Hisanaga et al, 2014) y neutralizando la susceptibilidad redox de la corteza cerebral que ha sido reportada por Haque et al, luego de la exposición a fitoextractos (Haque et al, 2007).

En cuanto al estudio histopatológico, se analizaron cortes de telencéfalo con distintos métodos de tinción para conocer el efecto de IP en integridad celular encefálica. Dado que este tipo de tumores (pulmón) presenta porcentajes importantes de complicaciones secundarias en SNC (Mayoral Chavez et al, 2004), como desarrollo de metástasis, se estudiaron células metastásicas en telencéfalo. Sin embargo, no se ha observado proceso metastásico en la región encefálica estudiada. Esto puede deberse al poco tiempo de evolución del tumor, ya que los ratones fueron sacrificados a los 21 días de ser inoculados, donde el deterioro del estado general de animal y el tamaño del tumor alcanzaron las condiciones éticas establecidas en estos diseños experimentales. A su vez, se han observado aumentos de la microglia y algunas figuras neuronales alteradas en los ratones tratados que podrían dar cuenta de un proceso inflamatorio incipiente, el cual está relacionado directamente con el proceso neoplásico primario y secundario (Strassman et al, 1996; Rosatto et al, 2013). Así mismo, en el análisis histopatológico, se encontró una reducción de la mielina cerebral en ratones con LAC-1, principalmente los que no recibieron tratamiento, lo que puede considerarse un daño neurológico mediado por inflamación inducido por cáncer de pulmón (Jurado-Gómez et al, 2001; Heinemann et al, 2008). Posteriormente, el principal efecto neuroprotector de IP determinado por la investigación actual fue la prevención de la desmielinización, con la correspondiente reducción de IL-6 en el cerebro, principalmente en diencéfalo. Con respecto a esto, IL-6 es una citoquina proinflamatoria con efectos dañinos sobre la sustancia blanca (Kim et al, 2015). Además, esta interleuquina es liberada por la glía, por lo que el tejido cerebral puede

autoalimentarse después de un daño, como es la respuesta paraneoplásica (Kim et al, 2015; Ye et al, 2017). La reducción significativa de IL-6 por IP en el cerebro (en diencéfalo con ambos tratamientos y en telencéfalo con IP50), pero no en la sangre, lo confirmó.

La actividad antiinflamatoria de IP está respaldada por sus compuestos bioactivos, como los polifenoles y otros antioxidantes (Cittadini et al, 2018; Bracesco et al, 2011; Heck et al, 2007; Gollucke et al, 2013). No obstante, los niveles cerebrales de estos compuestos y los peróxidos lipídicos (marcadores de estrés oxidativo) no se modificaron significativamente, aunque estos efectos si se observaron en ratones sanos que consumieron IP (Cittadini et al, 2015). Si bien los ratones con adenocarcinoma de pulmón no muestran cambios de las moléculas redox activas como peróxidos lipídicos y compuestos fenólicos en órganos como hígado, riñón e incluso tumor después de la ingesta de IP, se observó un ligero aumento fenólico en cerebro que puede ser concordante con la llegada de compuestos fenólicos específicos y sus metabolitos, debido al metabolismo previo, respuesta lipofílica y selectividad de la barrera hematoencefálica (Scheepers et al, 2008; Andrade et al, 2012) en ratones que recibieron ambas dosis de IP.

Por otro lado, El TNF $\alpha$ , al igual que la IL-6, es otra citoquina proinflamatoria, que también contrarresta el crecimiento neoplásico (Kim et al, 2015; Ye et al, 2017). Responde a mecanismos reguladores opuestos de acuerdo con diferentes condiciones, donde nuestro trabajo muestra una disminución no significativa con respecto al C, aunque estudios previos proponen IP como un inhibidor de esta citoquina (González de Mejía et al, 2010; Bracesco et al, 2011).

En este ensayo se observó que el extracto de IP suministró dos compuestos fenólicos: ácido clorogénico y quercetina, que se identificaron de forma dependiente de la dosis oral de IP en diferentes sitios orgánicos de ratones portadores de LAC-1 después de la ingesta. De acuerdo con el presente estudio, la investigación farmacológica ha establecido que ambos compuestos se metabolizan de manera altamente inducible, lo que explica su baja permanencia en el hígado. Esto se potencia por la capacidad de ambos compuestos de cruzar la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro (Andrade et al, 2012; Manach et al, 2005). En relación con esto, varias moléculas que son bioactivas *in vitro* son menos

efectivas *in vivo*, porque no pueden cruzar este límite (De Oliveira et al, 2017). Otro factor importante es que las regiones del cerebro pueden exhibir selectividad diferencial para obtener compuestos fenólicos del torrente sanguíneo (El Mohsen et al, 2002).

Estudios previos sugieren que IP es un buen candidato como fuente fenólica oral, ya que sus polifenoles están disponibles después de la digestión, lo que mejora la absorción intestinal (Albrecht et al, 2017). Los niveles de ácido clorogénico y quercetina encontrados en el cerebro pueden estar relacionados con las propiedades cinéticas (por ejemplo, el cumplimiento de las reglas de Lipinski), la afinidad tisular y la estabilidad bioquímica del líquido cefalorraquídeo y el microambiente encefálico, que está altamente regulado por la sangre, barrera cerebral y glía (De Oliveira et al, 2017; Kumar et al, 2018). El ácido clorogénico fue el principal compuesto encontrado después de la ingesta de IP, de acuerdo con estudios previos que informaron su alta concentración y predominio en este fitoextracto (Cittadini et al, 2018; Albrecht et al, 2017). Además, este ácido fenólico también se observó en los tumores para ambas dosis de IP, lo que puede ser ventajoso dado su potencial modulador del cáncer (Yamagata et al, 2018). En este sentido, los datos obtenidos en este ensayo sugieren que los efectos reguladores redox están presentes en diferentes órganos de ratones portadores de LAC-1, y esto está respaldado por la correlación entre la concentración clorogénica y los compuestos fenólicos con capacidad antioxidante observada en telencéfalo y diencefalo.

Por otro lado, se sabe que las funciones diencefálicas son cruciales para la integración orgánica y dependen de muchos factores, como la nutrición, la inmunidad y la neurotransmisión (Schreiner et al, 2017), y los compuestos fenólicos son capaces de regular estas respuestas locales y sistémicas beneficiosas (Miranda et al, 2017). Los datos previos han informado sobre los efectos de los derivados de IP sobre los ratones que portan LAC-1 contra la neuroinflamación, la desmielinización y la caquexia (Cittadini y Repossi, 2016). Aquí, el telencéfalo reveló niveles más bajos de IL-6 con una respuesta bifásica (una disminución en el caso de IP50, y un aumento para IP100), que refleja el complejo papel neurofisiológico y la regulación de esta citoquina. Además, IL-6 participa en la respuesta de las neuronas maduras y las células gliales tanto en condiciones normales como patológicas

que involucran mecanismos moduladores neuromorfinicos y neuroinmunes (Erta et al, 2012). Las diferentes respuestas de diencefalo y telencefalo a IP se deben a la heterogeneidad espacial del SNC (estructura, función y composición celular). Esto confiere una gran complejidad y múltiples mecanismos con una predilección por los xenobióticos en ciertos sistemas bioquímicos (Maurer y Philbert, 2015). De hecho, en diencefalo también se observó quercetina, una molécula antiinflamatoria (Ishisaka et al, 2014), que mejoró la reducción de IL-6 después del tratamiento con IP. Además, la glía y las neuronas responden de manera diferente a las moléculas fenólicas a diferentes dosis (Kapoor et al, 2006). En el presente trabajo, también se observó que el cáncer de pulmón induce la neurodegeneración en ratones (Kapoor et al, 2006), mientras que los cerebros tratados con IP mostraron efectos neuroprotectores de este extracto observados por una mejora en el recuento celular y la morfología. En este sentido, el cáncer de pulmón puede dañar el tejido nervioso e inducir la muerte celular durante su evolución (Giglio et al, 2010), mientras que los polifenoles tienen un potencial protector (Silva et al, 2017), además de la actividad antiapoptótica del ácido clorogénico reportada en la bibliografía (Anggreani et al, 2017). Así, esta neuroprotección promovida por IP concuerda con otros resultados ya reportados (Albrecht et al 2017; Cittadini et al, 2015 y 2018).



## **Conclusiones**

Como conclusiones generales, nuestros resultados mostraron que el extracto de IP administrado por vía oral condujo a una acumulación cerebral de ácido clorogénico y quercetina en ratones portadores de adenocarcinoma de pulmón, de manera dosis dependiente, donde ejercieron diferentes efectos neuroprotectores sobre el telencéfalo y el diencefalo, que llevó a aliviar el daño neurológico relacionado con las complicaciones del cáncer, como la neuroinflamación y la consiguiente desmielinización.

Desde el punto de vista nutricional, la importancia de este trabajo radica en que IP es una planta ampliamente consumida por los sudamericanos, con un consumo creciente en todo el mundo. Por lo tanto, su actividad neuroprotectora tiene un potencial de salud relevante al mejorar los efectos nocivos del cáncer, transferible al ámbito sanitario con importantes implicancias.

De esta manera, por los beneficios reconocidos de la utilización de extractos vegetales en la salud humana, y principalmente el consumo masivo de IP, resulta relevante profundizar su estudio para conocer la concentración adecuada y la biodisponibilidad de sus fitoquímicos potencialmente protectores en el SNC, describir sus efectos antioxidantes y anti-inflamatorios y, generar así, nuevas estrategias nutricionales y quimiopreventivas a partir de la ingesta de una planta de masivo y frecuente consumo en la población argentina.

## Bibliografía

1. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3ra ed. Filadelfia: PA: Saunders, Elsevier. Estados Unidos; 2009. 312 p.
2. Abib RT, Quincozes-Santos A, Zanotto C, Zeidán-Chuliá F, Lunardi PS, Gonçalves CA, et al. Genoprotective effects of the green tea-derived polyphenol/epicatechin gallate in C6 astroglial cells. *J Med Food*. 2010; 13(5):1111-5.
3. Albrecht C, Cittadini MC, Canalis AM, Valentich MA, Guzmán ML, Olivera ME, Soria EA. Bioavailability of phenolic compounds and redox state of murine liver and kidney as sex-dependent responses to phytoextracts. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2017; 74(4):338-344.
4. Alcaide Molina AJ. Caracterización de polifenoles y su acción sobre sirtuinas en modelos de inflamación intestinal y cáncer. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. Año 2015.
5. Al-Halabi R, Bou Chedid M, Abou Merhi R, El-Hajj H, Zahr H, Schneider-Stock R, et al. Gallotannin inhibits NFκB signaling and growth of human colon cancer xenografts. *Cancer Biol Ther*. 2011; 12(1):59-68.
6. Alonso J y Desmarchelier CJ. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus Libros Médicos y Científicos, 2015. p 748.
7. Andrade JP, Assuncao M. Protective effects of chronic green tea consumption on age-related neurodegeneration. *Curr Pharm Des*. 2012; 18:4-14.
8. Anggreani E, Lee CY. Neuroprotective effect of chlorogenic acids against Alzheimer's disease. *Int J Food Sci Nutr Diet*. 2017; 6(1):330-337.
9. Antunes-Ricardo M, Gutiérrez-Urbe JA, Martínez-Vitela C, Serna-Saldívar SO. Topical anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica*. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:847320.

10. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2009; 2(3):119-145.
11. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea. 2006; 494:161-72.
12. Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. Curr Pharm Des. 2009; 15(26):3063-73.
13. Bansode RR, Randolph P, Ahmedna M, Hurley S, Hanner T, Baxter SA, et al. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function. Food Chem. 2014; 148:24-9.
14. Barboza GE, Cantero JJ, Núñez C, Pacciaroni A, Ariza Espinar L. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. Kurtziana. 2009; 1-2(34):7-365.
15. Barrajión-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Roldán C, Guillén E, Saura D, et al. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. Phytochem Anal. 2011; 22:303-12.
16. Bellik Y, Hammoudi SM, Abdellah F, Iguer-Ouada M, Boukraâ L. Phytochemicals to prevent inflammation and allergy. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2012; 6(2):147-58.
17. Borneo R, León AE, Aguirre A, Robotta R, Cantero JJ. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chem. 2009; 112:664–670.
18. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. J Ethnopharmacol. 2011; 136(3):378-84.
19. Canalis AM, Cittadini MC, Albrecht C, Soria EA. In vivo redox effects of *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Lantana grisebachii* and *Ilex paraguariensis* on blood, thymus and spleen of mice. Indian J Exp Biol. 2014; 9(52):882-9.
20. Carmo LS, Rogero MM, Cortez M, Yamada M, Jacob PS, Bastos DH, et al. The Effects of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) consumption on IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 production by bone marrow cells in wistar rats fed a high-fat diet. Int J Vitam Nutr Res. 2013; 3(1):26-

35.

21. Chan K, Pillon N, Sivaloganathan D, Costford S, Liu Z, et al. Palmitoleate reverses high fat-induced pro-inflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem.* 2015; 290(27):16979-88.

22. Chlopicki S, Lomnicka M, Gryglewski RJ. Obligatory role of lipid mediators in platelet-neutrophil adhesion. *Thromb Res.* 2003; 15:287-292.

23. Cittadini MC, Canalis AM, Albrecht C, Soria EA. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. *Nutr Neurosci.* 2015; 7(18):316-22.

24. Cittadini MC, Repossi G: Efecto modulador del consumo de yerba mate (*ilex paraguariensis*) sobre el compromiso neurológico producido por cáncer de pulmón en ratones. En: INC. Informes finales cuarta cohorte de becarios. Buenos Aires: INC, 2016; 84-92.

25. Cittadini MC, Soria EA. Chemoprevention of the neurooncological development by redox-active phytoextracts of autochthonous species. En: INC. Informes finales tercera cohorte de becarios. Buenos Aires: INC, 2015; 39-49.

26. Cittadini MC, García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Valentich MA, Repossi G, et al. Modulation of Fatty Acids and Interleukin-6 in Glioma Cells by South American Tea Extracts and their Phenolic Compounds. *Nutr Cancer.* 2018; 70(2):267-277.

27. Clifford MN, Johnston KI, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51:2900–2911.

28. Comba A, Maestri DM, Berra MA, Garcia CP, Das UN, et al. Effect of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:112.

29. De la Cruz Conde JC. Citocinas proinflamatorias: participación en la modulación de la actividad del melanoma experimental b16. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. LEIOA, País Vasco. 2014.

30. De Oliveira DM, Sampaio GR, Pinto CB, Catharino RR, Bastos DH. Bioavailability of chlorogenic acids in rats after acute ingestion of maté tea (*Ilex paraguariensis*) or 5-caffeoylquinic acid. *Eur J Nutr.* 2017; 56(8):2541-56.
31. De Pascual-Teresa S. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 559:68-74.
32. Delgado Ciruelos L. Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. *Caenorhabditis elegans* y líneas celulares como sistemas modelo. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca. 2015.
33. Demaio P, Carlin UO, Medina M. Árboles, nativos de Argentina. Tomo I: Centro y Cuyo. 1ra Ed. Ecoval Ediciones. Córdoba, Argentina, 2015. p 182.
34. Dovizio M, Alberti S, Sacco A, Guillem-Llobat P, Schiavone S, Maier TJ, et al. Novel insights into the regulation of cyclooxygenase-2 expression by platelet-cancer cell cross-talk. *Biochem Soc Trans.* 2015; 43(4):707–714.
35. Ekiz E, Ozkok A, Ertugrul NK. Paraneoplastic mononeuritis multiplex as a presenting feature of adenocarcinoma of the lung. *Case Rep Oncol Med.* 2013:457346.
36. El Mohsen M, Kuhnle G, Rechner R, Schroeter H, Rose S, et al. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Rad Biol Med.* 2002; 12(33):1693-702.
37. Erro ME, Martínez M, Ayuso T, Iragui MI. Paraneoplastic polyneuropathy with anti-amphiphysin antibodies. *An Sist Sanit Navar.* 2004; 27(1):103-6.
38. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the Central Nervous System. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(9):1254–1266.
39. Estrella Pedrola I. Polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Disponible en: <https://studylib.es/doc/6988730/polifenoles-y-sus-propiedades-antioxidantes-isabel-estrel>. 2018.
40. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. Histología y Embriología Humanas. Bases celulares y moleculares con orientación clínico-patológica. 5ta ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2016. 800 p.

41. Ezuruike UF, Prieto JM. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: pharmacological and toxicological considerations. *J Ethnopharmacol.* 2014; 155(2):857-924.
42. Fernández Urquiza F, Torres Fuentes M. Inflamación y plantas medicinales. Organización Panamericana de la Salud. [citada 12/oct/2018]. Disponible en: [https://www.paho.org/cub/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=mnt&alias=896-inflamacion-y-plantas-medicinales&Itemid=226](https://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=mnt&alias=896-inflamacion-y-plantas-medicinales&Itemid=226).
43. Ferreres F, Grosso C, Gil-Izquierdo A, Valentao P, Azevedo C, et al. HPLC-DAD-ESI/MSn analysis of phenolic compounds for quality control of *Grindelia robusta* Nutt. and bioactivities. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 94:163-72.
44. Figueira I, Tavares L, Jardim C, Costa I, Terrasso P, Andreia F, et al. Blood–brain barrier transport and neuroprotective potential of blackberry-digested polyphenols: an *in vitro* study. *Eur J Nutr.* 2018; doi: 10.1007/s00394-017-1576-y.
45. Folch J, Lees M, Sloane S. A simple method from the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226:497-509.
46. Fresco P, Borges F, Marques MP, Diniz C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(1):114-34.
47. Fumery M, Speca S, Langlois A, Davila AM, Dubuquoy C, Grauso M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) regulates lactase expression and activity in the gut. *EMBO Mol Med.* 2017; 9(11):1471-1481.
48. Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 501(1):23-30.
49. García-Casal MN, Pons-García HE. Dieta e inflamación. *An Venez Nutr.* 2014; 27(1): 47-56.
50. García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Alcalde-Eon C: Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Anal Chim Acta.* 2010; 660:170-6.
51. García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Alcalde-Eon C. Validation of mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *J Agric Food*

Chem. 2012; 60:1373-9.

52. Giglio P, Gilbert MR. Neurologic complications of cancer and its treatment. *Curr Oncol Rep.* 2010; 12(1):50-9.

53. Goleniowski ME, Bongiovanni GA, Palacio L, Nuñez CO, Cantero JJ. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2006; 107(3):324-41.

54. Gollucke AP, Peres RC, Odair A Jr, Ribeiro DA. Polyphenols: a nutraceutical approach against diseases. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 2013; 5(3):214-9.

55. Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci.* 2013; 33(6):2481-93.

56. González de Mejía E, Songa YS, Hecka CI, Ramírez-Mares M. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *J Func Foods.* 2010; 1(2):23-34.

57. Gonzalez-Paramas AM, Ayuda-Duran B, Martinez S, Gonzalez-Manzano S, Santos-Buelga C. The mechanisms behind the biological activity of flavonoids. *Curr Med Chem.* 2018; doi: 10.2174/0929867325666180706104829.

58. González-Paramas AM, Ayuda-Duran B, Martinez S, González-Manzano S, Santos-Buelga C. The Mechanisms behind the Biological Activity of Flavonoids. *Curr Med Chem.* 2018. doi: 10.2174/0929867325666180706104829.

59. Goodman SR, Krebs KE, Whitfield CF, Riederer BM, Zagon IS. *CRC Crit Rev Biochem.* 1988; 23:171-234.

60. Grace-Lynn C, Darah I, Chen Y, Yoga Latha L, Jothy SL. In vitro antioxidant activity potential of lantadene A, a pentacyclic triterpenoid of Lantana plants. *Molecules.* 2012; 17:11185-98.

61. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr.* 2006; 136:1043-7.

62. Heck CI, González de Mejía E. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007; 72(9):138-51.

63. Heinemann S, Zabel P, Hauber HP. Paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Cancer Therapy*. 2008; 6:687-98.
64. Hernández-García D, Wood CD, Castro-Obregón S, Covarrubias L. Reactive oxygen species: A radical role in development?. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(2):130-143.
65. Hidalgo M, Oruna-Concha MJ, Kolida S, Walton GE, Kallithraka S, Spencer JPE, et al. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their Influence on gut bacterial growth. *J Agric Food Chem*. 2012, 60:3882–3890.
66. Hisanaga A, Ishida H, Sakao K, Sogo T, Kumamoto T, Hashimoto F, Hou D. Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of Oolong tea theasinensin. *Food Funct*. 2014; 5:1891–1897.
67. Huanqui-Guerra C. Oxidantes-Antioxidantes en Reumatología. *Rev. Perú Reum*. 1997; 3(1): 35-40.
68. Ishisaka A, Mukai R, Terao J, Shibata N, Kawai Y. Specific localization of quercetin-3-O-glucuronide in human brain. *Arch Biochem Biophys*. 2014; 557:11-7.
69. Jones DP, Go YM. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 2(12):116-25.
70. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. antioxidants & redox signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(9-10):1865-79.
71. Julião L de S, Leitão SG, Lotti C, Picinelli AL, Rastrelli L, Fernandes PD, et al. Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. *Phytochemistry*. 2010; 71(2-3):294-300.
72. Jurado Gámez B, Garcia De Lucas MD, Gudín Rodríguez M. Cáncer de pulmón y síndromes paraneoplásicos. *An Med Interna*. 2001; 18(8):440-46.
73. Kapoor N, Pant AB, Dhawan A, Dwivedi UN, Seth PK, Parmar D. Cytochrome P450 1A isoenzymes in brain cells: Expression and inducibility in cultured rat brain neuronal and glial cells. *Life Sci*. 2006; 79(25):2387-94.
74. Kido M, Tanaka J, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Chiba T, Watanabe N. *Helicobacter pylori* promotes the production of thymic stromal lymphopoietin by gastric epithelial cells



and induces dendritic cell-mediated inflammatory Th2 responses. *Infect Immun.* 2010; 78(1):108-14.

75. Kim KJ, Baek IW, Yoon CH, Kim WU, Cho CS. Association of anemic hypoxia and increased pulmonary artery systolic pressure in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2015; 67(12):1702-11.

76. Koike H, Sobue G. Paraneoplastic neuropathy. *Handb Clin Neurol.* 2013; 115:713-26.

77. Kumar A, Foster TC. Alteration in NMDA Receptor Mediated Glutamatergic Neurotransmission in the Hippocampus During Senescence. *Neurochem Res.* 2018; doi: 10.1007/s11064-018-2634-4.

78. Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA. Modulation of glioma risk and progression by dietary nutrients and anti-inflammatory agents. *Nutr Cancer.* 2011; 63(2):174-84.

79. Latruffe N, Rifler JP. Bioactive polyphenols from grapes and wine emphasized with resveratrol. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(34):6053-63.

80. Layne T, Roach J, Tinto W: Review of  $\beta$ -carboline alkaloids from the genus *Aspidosperma*. *Nat Prod Commun.* 2015; 10:183-6.

81. Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MBH, Mandel S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3gallate prevents N-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry.* 2001; 78(5):1073–1082.

82. Li QS, Xi H, Han GZ, Wang CY, Lü L, Zou LL, Li N. Integrated pharmacokinetic study of multiple effective components of tea polyphenols and its correlation with anti-free radical pharmacodynamics in rats. *Yao Xue Xue Bao.* 2012; 47:863-9.

83. López Carreras N, Miguel M, Aleixandre A. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. clín. diet. hosp.* 2012; 32(3):81-91.

84. Macrae K, Stretton C, Lipina C, Blachnio-Zabielska A, Baranowski M, et al. Defining the role of DAG, mitochondrial function, and lipid deposition in palmitate-induced pro-inflammatory signaling and its counter-modulation by palmitoleate. *J Lip Res.* 2013; 54(9):2366-78.

85. Manach C, Williamson C, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.*

2005; 81:230S–42S.

86. Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DH, et al. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *Br J Nutr.* 2009; 101(4):527-32.
87. Maurer LL, Philbert MA. The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites. *Handbook Clinical Neurology.* 2015; 131:61-70.
88. Mayoral Chávez MA. Perspectiva monográfica del cáncer de pulmón: un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2004; 17(4):283-292.
89. Mesa García MD, Aguilera García CM, Gil Hernández A. Importancia de los lípidos en el tratamiento nutricional de las patologías de base inflamatoria. *Nutr. Hosp.* 2006; 21(2):30-43.
90. Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer [página web]. Argentina; 2014. [citado 7 de abril de 2014]. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/>.
91. Miranda AR, Cittadini MC, Albrecht C, Soria EA. Regional oxidative stress in encephalon of female mice with polyphenolic exposure from tea extracts in oral overweight plant-based treatment. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2017; 74(3):197-202.
92. Muñoz-Velázquez EE, Rivas-Díaz K, Loarca-Piña MGF, Mendoza-Díaz S, Reynoso-Camacho R, Ramos-Gómez M. Comparison of phenolic content, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of commercial herbal infusions. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2012; 3(3):481-95.
93. Niclis C, Pou SA, Shivappa N, Hébert JR, Steck SE, Díaz MDP. Proinflammatory Dietary Intake is Associated with Increased Risk of Colorectal Cancer: Results of a Case-Control Study in Argentina Using a Multilevel Modeling Approach. *Nutr Cancer.* 2018; 70(1):61-68.
94. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2(5):270-8.
95. Pardridge WM. The blood-brain barrier. Permeability, substrate transport and drug and gene targeting. In Edvinsson L, Krause DN, eds. *Cerebral blood flow and metabolism.* 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 119-39.

96. Park KS, Kim BH, Il-Moo C. Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in vitro. *eCAM*. 2010; 7:41-5.
97. Pascual-Garvi JM, González-Llanos F, Prieto-Arribas R, Cerdán S, Roda JM. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Rev Neurol*. 2004; 38(6):565-581.
98. Piegari M, Ortiz S, Díaz Mdel P, Eynard AR, Valentich MA. Characterization of a murine lung adenocarcinoma (LAC1), a useful experimental model to study progression of lung cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2011; 9(3):231-9.
99. Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35(1):75-91.
100. Puangpraphant S, Berhow MA, Vermillion K, Potts G, Gonzalez de Mejia E. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- $\kappa$ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2011; 55(10):1509-22.
101. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Neuroanatomía. 1ra ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2008. 416 p.
102. Purves D. Neurociencia. 5ra ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2016. 800 p.
103. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*. 2012; 27(1):76-8.
104. Quiroga A, Quiroga PL, Martínez E, Soria EA, Valentich MA. Anti-breast cancer activity of curcumin on the human oxidation-resistant cells ZR-75-1 with gamma-glutamyltranspeptidase inhibition. *J Exp Ther Oncol*. 2010; 8:261-6.
105. Ramirez-Mares MV, Chandra S, de Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res*. 2004; 554(1-2):53-65.

106. Ramos Elizagaray SI: Actividad quimiopreventiva e inmunoprotectora del extracto acuoso de *Lantana grisebachii* Seckt. en hidroarsenicismo experimental. Tesina de Medicina, Universidad Nacional de Córdoba, 2013.
107. Rasband MN. Glial Contributions to Neural Function and Disease. *Mol Cell Proteomics*. 2016; 15(2):355-61.
108. Ratera EL, Ratera MO. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Argentina: Editorial Hemisferio Sur, S.A.; 1980, p.150.
109. Rocha DS, Casagrande L, Model JFA, Dos Santos JT, Hoefel AL, Kucharski LC. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. 2018; 105:370-376.
110. Rossato M, Zabeo E, Burei M, Cecchin D, Guzzardo V, Fassina A, et al. Lung cancer and paraneoplastic neurologic syndromes. Case report and review of the literature. *Clin Lung Cancer*. 2013; 14(3):301-9.
111. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Phytochemicals suppress nuclear factor- $\kappa$ B signaling: impact on health span and the aging process. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012; 15(1):23-8.
112. Samsel A, Seneff E. Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases Anthony Entropy. 2013; 15(4):1416-1463.
113. Sánchez P, Segundo M: Omega 7 Su papel en el cuidado de la piel y las mucosas. En: *Ámbito Financiero. Nutrición*. Ed. El Servier. España: vol 26, núm 7. 2007.
114. Santos-Buelga C. Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. V Congreso Internacional Alimentación, nutrición y dietética. Disponible en: [http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista\\_marzo\\_02/VCongreso\\_publicaciones/Conferencias/Santos.pdf](http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Santos.pdf).
115. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. NF- $\kappa$ B signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol*. 2008; 27(5):293-319.
116. Scheepens A, Tan K, Paxton JW. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr*. 2010; 5:75-87.

117. Schreiner F, Ackermann M, Michalik M, Hucklenbruch-Rother E, Bilkei-Gorzo A, Racz I, et al. Developmental programming of somatic growth, behavior and endocannabinoid metabolism by variation of early postnatal nutrition in a cross-fostering mouse model. *PLoS One*. 2017; 12(8), e0182754.
118. Silva, R.F.M., Pogačnik, L. Food, polyphenols and neuroprotection. *Neural Regeneration Research*. 2017; 12(4):582-3.
119. Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol*. 2008; 27(4):341-6.
120. Soria EA, Quiroga PL, Albrecht C, Ramos Elizagaray SI, Cantero JJ, et al. Development of an antioxidant phytoextract of *Lantana Grisebachii* with lymphoprotective activity against in vitro arsenic toxicity. *Adv Pharmacol Sci*. 2014:416761.
121. Sousa EO, Miranda CM, Nubre CB, Boligon AA, Athayde ML: Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana Camara* and *Lantana Montevidensis* extracts. *Ind Crops Prod*. 2015; 70:7-15.
122. Spencer JP, Manal M, El Mohsen A, Minihane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British J Nutr*. 2008; 99:12–22.
123. Steibel PE. Las Verbenáceas (Verbenaceae J. St.-Hil.) de la Provincia de La Pampa, Argentina. *Rev Fac Agronomía*. 2000; 11(1):1-30.
124. Strassmann G, Jacob CO, Fang M et al. Mechanisms of paraneoplastic syndromes of colon-26 involvement of interleukin 6 in hypercalcemia. *Cytokine*. 1993; 5:463-68.
125. Suzuki S, Hongli Q, Okada A, Kasama T, Ohta K, et al: BDNF-dependent accumulation of palmitoleic acid in CNS neurons. *Cell Mol Neurobiol*. 2012; 32:1367-73.
126. Taleisnik S. *Neuronas. Desarrollo, lesiones y regeneración*. 1ra ed. Argentina: Editorial Encuentro, grupo editor; 2010. 427 p.
127. Tan J, Li L, Shi W, Sun D, Xu C, Miao Y, et al. Protective Effect of 2-Hydroxymethyl Anthraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung

Injury Mediated by TLR4-NF- $\kappa$ B Pathway. *Inflammation*. 2018; 10.1007/s10753-018-0857-9.

128. Tomás-Barberán FA, Selma MV, Espín JC. Polyphenols' Gut Microbiota Metabolites: Bioactives or Biomarkers?. *J Agric Food Chem*. 2018; 66(14):3593-3594.

129. Tomás-Barberán FA. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alim Nutri Salud*. 2003; 10(2):41-53.

130. Vandenhoute E, Dehouck L, Boucau MC, Sevin E, Uzbekov R, Tardivel M, et al. Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. *Curr Neurovasc Res*. 2011; 8(4):258-69.

131. Vasilopoulou CG, Kontogianni VG, Linardaki ZI, Iatrou G, Lamari FN, Nerantzaki AA, et al. Phytochemical composition of "mountain tea" from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. *Eur J Nutr*. 2013; 52:107-16.

132. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Orunda-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human Health: prevention of disease and mechanism of action. 2010; 2:1106-31.

133. Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:914273.

134. Vera F, Costa G, Figueirinha A, Marques C, Pereira P, Neves BM, et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- $\kappa$ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid. *J Ethnopharmacol*. 2013; 148(1):126-34.

135. Viljoen A, Mncwangi N, Vermaak I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. *Curr Med Chem*. 2012; 19(14):2104-27.

136. Welbourne TC, Dass PD. Function of renal gamma-glutamyltransferase: significance of glutathione and glutamine interactions. *Life Sci*. 1982; 30(10):793-801.

137. White LB, Foster S. *El Recetario Herbario: Las mejores alternativas naturales a los medicamentos*. 1ra edición. Editorial: Rodale Books. Estados Unidos: 2004. 672 p.

138. Xu P, Du S, Lu Y, Bai J, Liu H, et al. UPLC-MS/MS determination of content of three iridoids of xingnaojing oral preparation in rat brains and study on their brain pharmacokinetics. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2014; 39(12):2351-5.
139. Yamagata, K., Izawa, Y., Onodera, D., Tagami, M. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2018; 441(1-2):9-19.
140. Yaqoob P: Lipids and the immune response: from molecular mechanisms to clinical applications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6:133-150
141. Ye J, Jiang Z, Chen X, Liu M, Li J, Liu N. The role of autophagy in pro-inflammatory responses of microglia activation via mitochondrial reactive oxygen species in vitro. *J Neurochem*. 2017; 142(2):215-230.
142. Young-Joon S. NF- $\kappa$ B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008; 17(S1):269-72.
143. Zamin LL, Filippi-Chiela EC, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, Lenz G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci*. 2009; 100(9):1655-62.
144. Zini A, Del Rio D, Stewart AJ, Mandrioli J, Merelli E, Sola P, et al. Do flavan-3-ols from green tea reach the human brain?. *Nutr Neurosci*. 2006; 9(1-2):57-61.

## **Anexos**

Anexo 1. Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (año 2013).

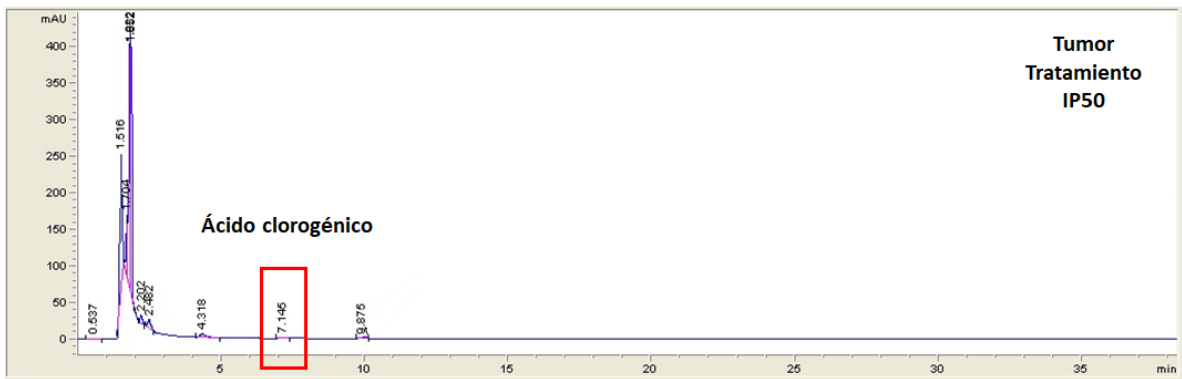
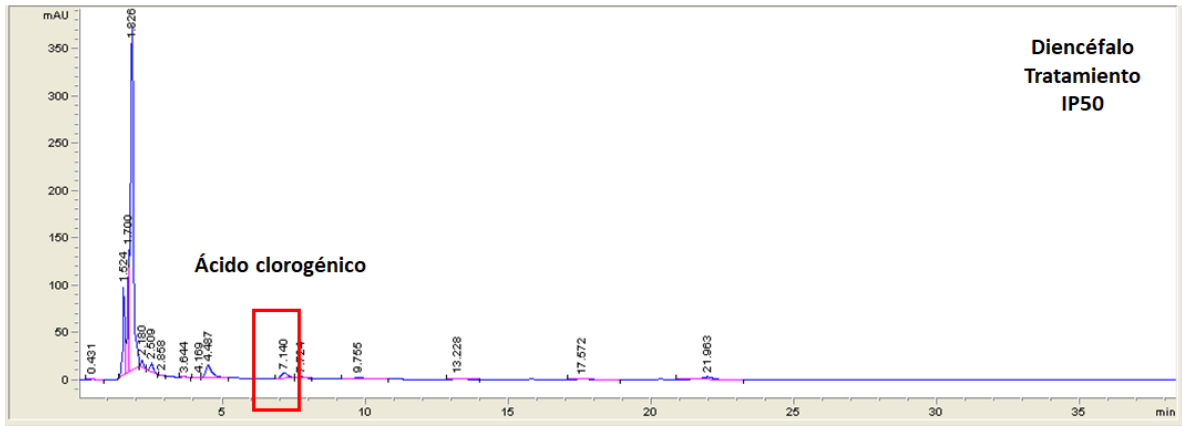
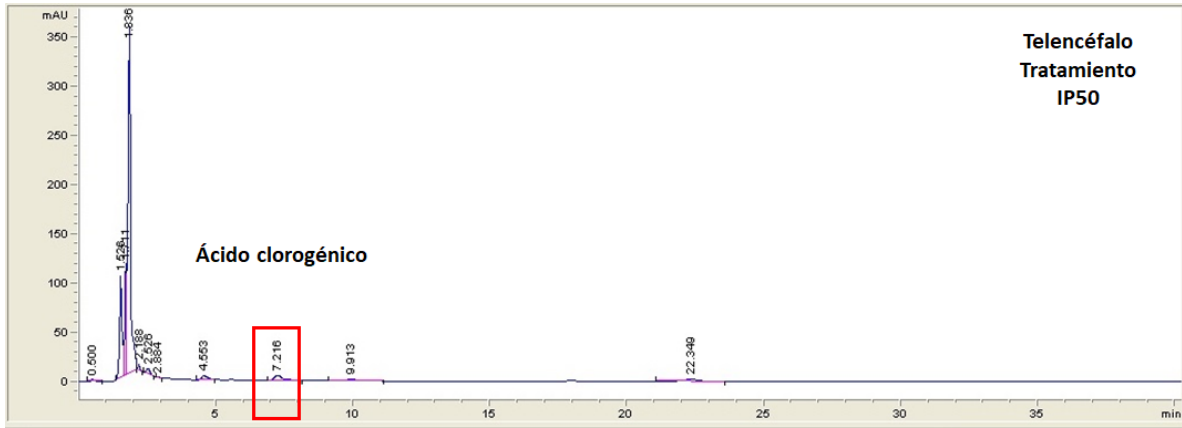
Anexo 2. Cromatogramas individuales de telencéfalo, diencéfalo, tumor e hígado de ratones tratados con 50 o 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis*.

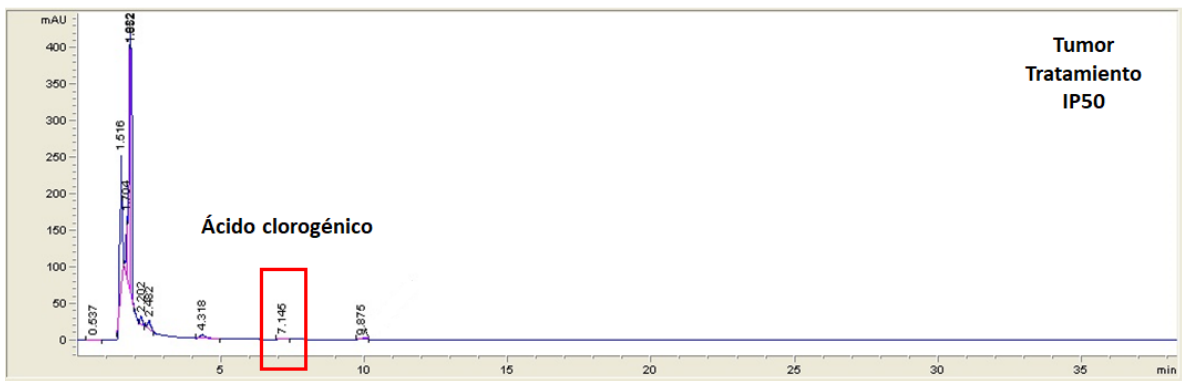
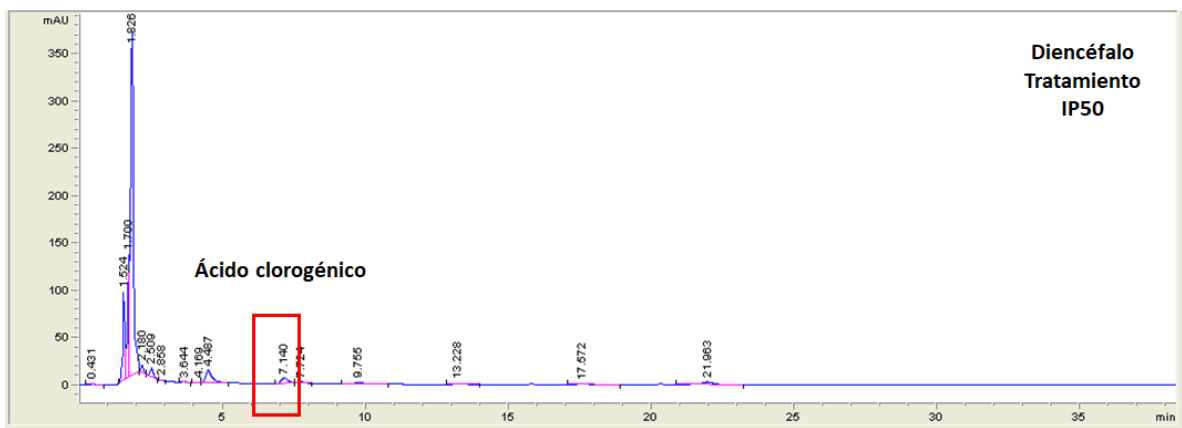
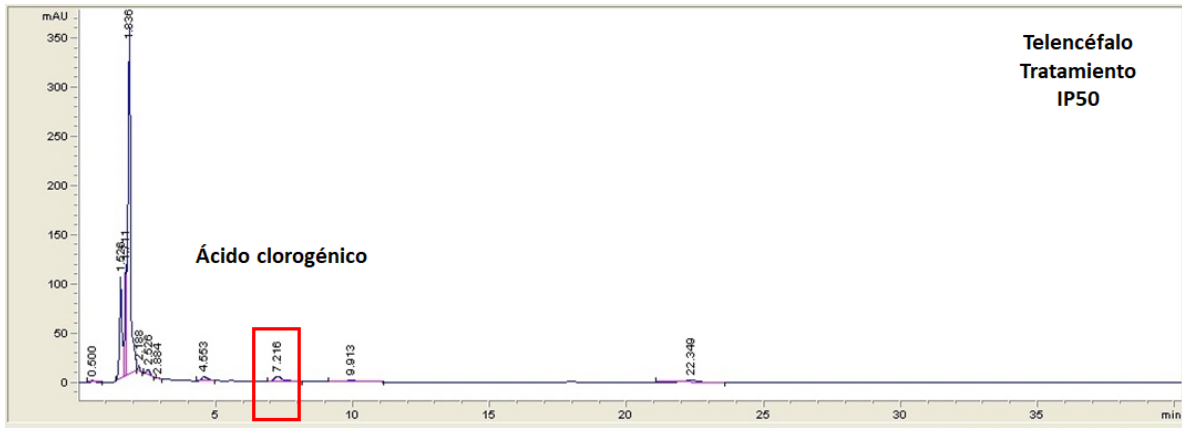
Anexo 3. Producción científica.

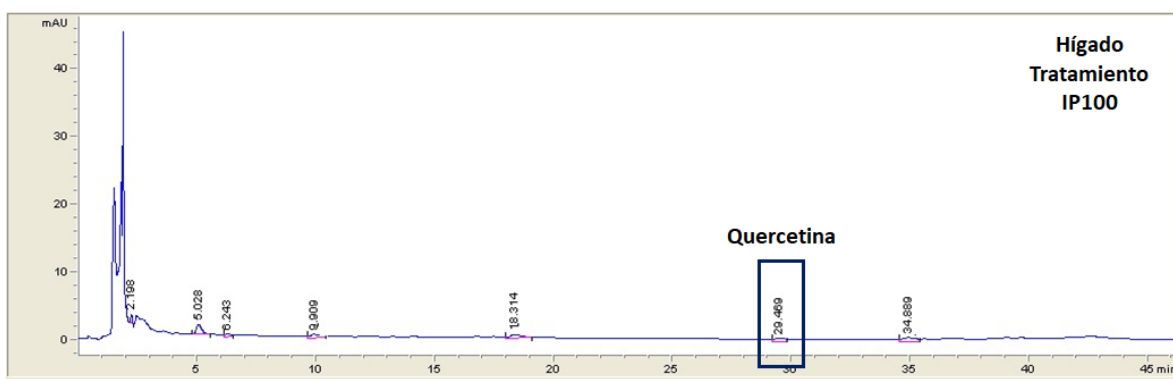
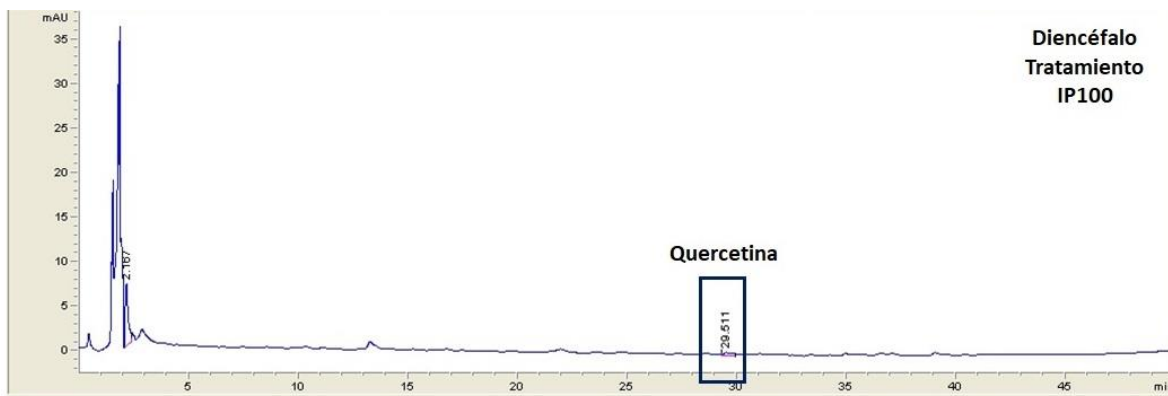




## Anexo 2







### Anexo 3.

#### Publicaciones en revistas científicas

- **Cittadini MC**, Albrecht C, Miranda AR, Mazzuduli GM, Soria EA, Repossi G. Neuroprotective effect of *Ilex paraguariensis* intake on brain myelin of lung adenocarcinoma-bearing male Balb/c mice. *Nutrition and Cancer*. Aceptado noviembre 2018.
- **Cittadini MC**, García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Valentich, M.A., Repossi, G., Soria, E.A. Modulating activity of phenolic compounds from American plant infusions on fatty acid-related interleukin-6 release in glial cells. *Nutrition and Cancer*. 2018; 70(2), 267-77.
- **Cittadini MC**, Canalis AM, Albrecht C, Soria EA. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. *Nutritional Neuroscience*. 215;18(7), 316-22.

#### Capítulo de libro

- Cittadini MC**, Repossi G. (2016) Efecto modulador del consumo de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) sobre el compromiso neurológico producido por cáncer de pulmón en ratones. En: Instituto Nacional del Cáncer. Informes finales cuarta cohorte de becarios: Becas de formación inicial en investigación en cáncer 2014-2015. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud. pp. 84-92.
- **Cittadini MC**, Soria EA. (2015) Quimioprevención del desarrollo neuro-oncológico por fitoextractos redox-activos de especies autóctonas. En: Instituto Nacional del Cáncer. Informes finales tercera cohorte de becarios: Becas de formación inicial en investigación en cáncer 2013-2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud. pp. 39-49.

### **Publicaciones científicas enviadas**

- **Cittadini MC**, Repposi G, Albrecht C, Di Paola R, Miranda AR, De Pascual-Teresa S, Soria EA. Effects of Bioavailable Phenolic Compounds from *Ilex paraguariensis* on the Brain of Mice with Lung Adenocarcinoma. *Phytotherapy Research*. Enviado junio 2018.

### **Publicaciones científicas en colaboración**

- Albrecht C, **Cittadini MC**, Soria EA. Differential Organic Improvement and Redox Targeting by Phytosupplementation with *Ilex Paraguariensis* A. *St-Hil.* Extract, 5-Caffeoylquinic Acid and Quercetin on Murine Lung Adenocarcinoma. *Journal of Dietary Supplements*. Enviado julio 2018.

- Albrecht C, **Cittadini MC**, Canalis AM, Guzmán ML, Olivera ME, Soria EA. Bioavailability of phenolic compounds and redox state of murine liver and kidney as sex-dependent responses to phytoextracts. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba* 2017; 74:338-44.

- Miranda AR, **Cittadini MC**, Albrecht C, Soria EA. Regional oxidative stress in encephalon of female mice with polyphenolic exposure from tea extracts in oral overweight plant-based treatment. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba*. 2017; 74:197-202.

- Canalis AM, **Cittadini MC**, Albrecht C, Soria EA. Sex-related redox effects of *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Lantana grisebachii* and *Ilex paraguariensis* on blood, thymus and spleen of mice. *Indian J Exp Biol*. 2014; 52(9):882-9.

### **Presentaciones a Eventos Científicos**

*Disertante en Eventos Científicos*

**Cittadini MC.** Efecto del consumo de Yerba Mate en Salud. Jornada de Actualización Fonoaudiológica. Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud. Córdoba, Argentina, octubre 2017.

**Cittadini MC.** Efecto neuroprotector de la yerba mate en oncología experimental. IV Jornada Científica “Yerba mate y salud”. Rosario, Argentina, agosto 2017.

#### *Presentaciones Orales*

**Cittadini MC,** Albrecht C, Miranda AR, Mazzuduli GM, Soria EA, Repossi G. Neuroprotective effect of *Ilex paraguariensis* intake on brain myelin of lung adenocarcinoma-bearing male Balb/c mice. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, Argentina. Octubre 2018.

#### *Otras presentaciones*

**Cittadini MC,** Repossi G, Albrecht C, Di Paola R, Miranda AR, De Pascual-Teresa S, Soria EA. Neuroprotective Effects of Bioavailable Phenolic Compounds from *Ilex paraguariensis* on the Brain of Mice with Lung Adenocarcinoma. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, Argentina, octubre 2018.

**Cittadini MC,** García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Valentich MA, Repossi G, Soria EA. “Effects of dietary phenolic compounds from South American plants on fatty acid-mediated interleukin-6 release from mammalian glial cells”. IUNS 21st ICN International Congress of Nutrition. Buenos Aires, octubre 2017.

**Cittadini MC,** Repossi G, Albrecht C, Soria EA. Efecto neuroprotector de la yerba mate en oncología experimental”. IV Jornada Científica “Yerba mate y salud”. Rosario, Argentina, agosto 2017.

**Cittadini MC,** Albrecht C, Canalis AM, Valentich MA, Repossi G, Soria EA. Blood phenolics levels as biomarkers of its concentration and bioactivity on central nervous system of mice

exposed to plant infusions. Oxygen Club of California World Congress, "Oxidants and antioxidants in biology". España, Valencia, junio 2015.

**Cittadini MC**, Repossi G, Soria EA. Phytoextract effects on lipids of murine telencephalon and their redox implications. 3° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina, septiembre 2014.

**Cittadini MC**, Canalis AM, Albrecht C, Soria EA. "Sex-dependent changes in the level of reactive species and phenols in brain regions of mice treated with plant extracts". VI Conference on Polyphenols and Health. Universidad de Buenos Aires- Fac. de Farmacia y Bioquímica. Argentina, Buenos Aires, octubre 2013.

*Presentaciones en colaboración*

Soria EA, Canalis AM, Scotta AV, **Cittadini MC**, Albrecht C, Bongiovanni G. Derivados de Yerba Mate frente a contaminantes. V Jornada de Divulgación Científica sobre Yerba Mate y Salud. Mendoza, Argentina, agosto 2018.

Soria EA, Orosz L, Miranda AR, Vera Andrade KL, **Cittadini MC**, Scotta AV, Cortez MV. Consumo de yerba mate y composición de la leche materna. IV Jornada Científica "Yerba mate y salud". Rosario, Argentina, agosto 2017.

Soria EA, **Cittadini MC**, Canalis AM, Miranda AR, Scotta AV, Bongiovanni GA, Valentich MA, Repossi G, Albrecht C. "Papel regulador de derivados de la yerba mate sobre el cáncer". III Jornada de Divulgación Científica sobre Yerba Mate y Salud. Córdoba, Argentina, agosto 2016.

Albrecht C, Canalis AM, **Cittadini MC**, Valentich MA, Perez RD, Soria EA. Effect of dietary polyphenols on metal homeostasis and lipid oxidation of murine liver. Oxygen Club of



California World Congress, "Oxidants and antioxidants in biology". España, Valencia, junio 2015.

Miranda AR, Leonangeli S, **Cittadini MC**, Canalis AM, Albrecht C, Soria EA. Weight and redox effects of infusive phytoextracts on overweight female mice treated for fifteen days. 3° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Argentina, Córdoba, septiembre 2014.

Albrecht C, Canalis AM, **Cittadini MC**, Soria EA. "Bioavailability of Phytochemicals in Murine Metabolic Organs, After Consumption of Infusions of Argentinean Native Plants". VI Conference on Polyphenols and Health. Universidad de Buenos Aires- Fac. de Farmacia y Bioquímica. Argentina, Buenos Aires, octubre 2013.

Canalis AM, **Cittadini MC**, Albrecht C, Soria EA. "Dimorphism by sex in haemolymphtic distribution of polyphenols and redox response of mice treated with native plant extracts". VI Conference on Polyphenols and Health. Universidad de Buenos Aires- Fac. de Farmacia y Bioquímica. Argentina, Buenos Aires, octubre 2013.