



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Evaluación del efecto inmunomodulador
y antitumoral de flavonoides presentes en
Nectandra angustifolia y *Cissampelos pareira*

Tesis para la obtención del título de:
Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en Química

Tesista FERRINI, LEANDRO ADRIAN

Director: Dr. RODRÍGUEZ, JUAN PABLO

Codirectora: Dra. TORRES, ANA MARIA

Subdirectora: Dra. AGUIRRE, MARIA VICTORIA

Instituto de Química Básica y Aplicada del Nordeste Argentino (IQUIBA-NEA)

AÑO 2024

DEDICATORIA

*A Flavio y Susana, mis padres, por impulsarme siempre a
cumplir mis metas y acompañar en todo el proceso.*

Si se pudo.

Agradecimientos

Personalmente la carrera de doctorado es un desafío que requiere no solo habilidades cognitivas sino habilidades emocionales, lidiar con el fracaso de experimentos y seguir adelante. Haber alcanzado la meta de presentar esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de los individuos que han acompañado este recorrido, he de detenerme a mencionarlos y quizás peque de omisión con alguno.

Primeramente, a mi círculo íntimo, familia y novia cuyo soporte emocional y aliento fueron necesarios durante los distintos altibajos de la carrera. Incluso me han hecho compañía en mi estancia en el exterior. Representan una base, un núcleo sobre el cual fui capaz de sostenerme y seguir adelante hasta la meta propuesta. No hay palabras que representen lo agradecido que estoy.

En particular a mi compañera de vida, Neri que siempre supo entender los horarios experimentales, las interminables deadlines, la distancia durante la estancia en el exterior gracias por todo tu apoyo.

Mis amistades de toda la vida, aquellos que nos conocimos en la escuela primaria y secundaria, por aun desconociendo el tema totalmente presentaron una vía de escape a la vida de becario.

A mis colegas profesionales y amigas Yanet Franco y Daiana Luque, por su continuo aliento y apoyo moral.

A mis compañeras del Laboratorio de Productos Naturales, por el acompañamiento, la comprensión y la ayuda mutua en diversas técnicas. En especial a Melissa González por el apoyo con el HPLC preparativo.

Al Dr. Juan Pablo Melana Colavita, mi primer compañero de laboratorio en el LIBIM y quien me instruyó en las artes del cultivo celular y ahora desde la posición de CPA por su predisposición y colaboración con el espectrómetro de masas. Indudablemente un excelente profesional.

Al Dr. Juan Santiago Todaro por su ayuda con la manipulación de animales y en el LIBIM en general.

Al Dr. Gonzalo Ojeda por la asistencia en materia relacionada al HPLC y por su apoyo en la carrera de investigación futura.

A la Dra. Callejo Nieto por recibirme en su laboratorio de España con los brazos abiertos al igual que a todos los miembros del laboratorio E7. Hablando de la estancia, a la AUIP por financiar los pasajes y darle un marco a la movilidad recibida.

Al laboratorio central de redes y programas de corrientes y en particular al Bioq. Emiliano Sotelo por su colaboración con la parte de citometría de flujo realizada.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el aporte de Alexandra Elbakyan y su lucha por una ciencia sin fronteras monetarias.

A las instituciones, primero a la Universidad Nacional del Nordeste por ser de carácter público y gratuito y permitir acceder a educación de calidad tanto en el grado como en el posgrado. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada que me permitió desempeñarme como becario de manera exclusiva.

A mis directores de beca y de tesis por mostrarme las distintas aristas de hacer ciencia, el Dr. Juan Pablo Rodríguez, la Dra. María Victoria Aguirre y la Dra. Ana María Torres cada uno con su visión particular de este trabajo. Por su mentoría activa y capacidad de enseñanza.

Por último, me gustaría agradecer al Leandro del pasado por todas las experiencias realizadas, los cursos afuera, la interminable búsqueda del conocimiento y las ganas de hacer las cosas de una manera diferente, solo decirte que si se pudo. Lo logramos.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN	6
CAPITULO 2 – MATERIALES Y MÉTODOS	30
CAPITULO 3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
CAPITULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
CAPITULO 5 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
CAPITULO 6 – PROYECCIONES	106
CAPITULO 7 – CONCLUSIONES.....	111
CAPITULO 8 – BIBLIOGRAFÍA	114

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS

- **Ferrini, L.**, Rodríguez, J. P., Colavita, J. P. M., Olea, G., Ojeda, G. A., Ricciardi, G., Torres, A. M. & Aguirre, M. V. (2021). Anti-inflammatory activity of *Nectandra angustifolia* (Laurel Amarillo) ethanolic extract. Journal of Ethnopharmacology, 272, 113937. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113937>
- Crescitelli, M. C., Simon, I., **Ferrini, L.**, Calvo, H., Torres, A. M., Cabero, I., Panedas, M., Rauschemberger, M. B., Aguirre, M. V., Rodriguez, J. P., Hernández, M. & Nieto, M. L. (2023). Anti-neuroinflammatory potential of a *Nectandra angustifolia* (Laurel Amarillo) ethanolic extract. Antioxidants, 12(2), 232. <https://doi.org/10.3390/antiox12020232>

ABREVIATURAS

CpE: Extracto etanólico de *Cissampelos pareira*

COX-2: Ciclooxigenasa-2

DAD: Detector de arreglo de diodos

DMSO: Dimetil sulfóxido

DPBA: Ácido difenilborónico 2-aminoetil ester

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

i.p.: Intraperitoneal

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

LPS: Lipopolisacárido bacteriano

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

NaE: Extracto etanólico de *Nectandra angustifolia*

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de células B activadas

Nrf2: Factor nuclear relacionado con el eritroide 2

PBS: Solución tampón de fosfato

ROS: Especies reactivas del oxígeno

TLC: Cromatografía en capa delgada

TLR: Receptor de tipo toll

UV: Ultravioleta

Resumen

Nectandra angustifolia (Schrad.) Nees & Mart. y *Cissampelos pareira* L. son especies vegetales autóctonas cuyos extractos se han utilizado en etnomedicina para el tratamiento de diferentes afecciones. Es de particular interés el uso de sus componentes bioactivos para contrarrestar los efectos inflamatorios locales observados en accidentes ofídicos. El veneno de serpientes locales, especialmente las del género *Bothrops*, produce una inflamación (edema y hemorragia) que los antivenenos comerciales no logran controlar por completo. Además, estos extractos son ricos en flavonoides, un grupo de compuestos naturales con potencial actividad antitumoral.

Para ello se recogieron partes aéreas, que luego se secaron por oreo y se obtuvo un extracto por maceración con etanol (NaE o CpE). En los mismos se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides totales y su actividad antioxidante cuantitativa por DPPH. Se determinó posteriormente el perfil cromatográfico por HPLC-DAD identificándose picos compatibles con flavonoides.

Se utilizaron diferentes líneas tumorales humanas y no tumorales para corroborar el efecto de los extractos. Ambos extractos mostraron actividad citotóxica en concentraciones mayores a las buscadas para aplicaciones antitumorales. Estos resultados no descartan una posible aplicación en terapias combinadas.

Usando una línea celular de macrófagos murinos se determinó la actividad antiinflamatoria de los extractos por medio de la inhibición de la expresión de ARNm de interleucinas proinflamatorias en un modelo de estímulo con LPS, obteniendo un mejor resultado para NaE. Con este extracto se comprobó la vía de inhibición por NF- κ B y posteriormente se trasladaron los resultados a modelos *in vivo* de inflamación. Posteriormente los resultados fueron comprobados en una línea celular de microglía murina.

El siguiente paso en la investigación involucró la obtención de fracciones de los extractos enteros para atribuir el efecto observado a los flavonoides presentes. Se realizó un cribado en la línea de macrófagos y en los mejores se comprobó la actividad por la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios en el modelo de estímulo con LPS. Posteriormente se utilizó un nuevo cribado, esta vez en la línea de microglía murina y con el mejor extracto se comprobó la inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias, la expresión de proteínas involucradas con la inflamación y la caracterización de su actividad antioxidante.

Estos resultados muestran que NaE contiene flavonoides glicosilados, compatibles con glicósidos de quercetina y kaempferol, con propiedades antiinflamatorias que resultarían una opción atractiva para el futuro diseño de fito-fármacos con distintas aplicaciones en biomedicina.

Abstract

Nectandra angustifolia (Schrad.) Nees & Mart. and *Cissampelos pareira* L. are native plant species whose extracts have been used in ethnomedicine for the treatment of various diseases. Of particular interest is the use of their bioactive components to counteract local inflammatory effects observed in snakebite incidents. The venom from local snakes, especially those of the genus *Bothrops*, causes inflammation (edema and hemorrhage) that commercial antivenoms do not completely control. Additionally, these extracts are rich in flavonoids, a group of natural compounds with potential antitumor activity.

To study this, aerial parts were collected, dried by air, and an extract was obtained through maceration with ethanol (NaE or CpE). The total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity were quantified using the DPPH method. The chromatographic profile was subsequently determined using HPLC-DAD, identifying peaks compatible with flavonoids.

Different human cancer cell lines and non-tumoral lines were used to corroborate the effects of the extracts. Both extracts showed cytotoxic activity at concentrations higher than those sought for antitumor applications. These results do not rule out a possible application in combined therapies.

Using a murine macrophage cell line, the anti-inflammatory activity of the extracts was determined by inhibiting the expression of mRNA for pro-inflammatory interleukins in an LPS stimulation model, with NaE showing better results. This extract demonstrated inhibition via the NF- κ B pathway, and the results were later transferred to *in vivo* inflammation models. The findings were subsequently verified in a murine microglia cell line.

The next step in the research involved obtaining fractions of the whole extracts to attribute the observed effects to the flavonoids present. Screening was conducted on the macrophage line, and the best fractions were tested for their ability to inhibit the expression of pro-inflammatory genes in the LPS stimulation model. A new screening was then performed on the murine microglia line, where the best extract was tested for its ability to inhibit the release of pro-inflammatory cytokines, the expression of proteins involved in inflammation, and to characterize its antioxidant activity.

These results show that NaE contains glycosylated flavonoids, compatible with quercetin and kaempferol glycosides, with anti-inflammatory properties, which could be an attractive option for the future design of phytopharmaceuticals with various applications in biomedicine.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1.	Valorización de los productos naturales en el NEA	8
1.2.	Productos Naturales. Definiciones y clasificación	9
1.2.1.	Policétidos.....	10
1.2.2.	Terpenos.....	11
1.2.3.	Alcaloides.....	11
1.2.4.	Derivados del ácido shikímico.....	11
1.3.	Flavonoides	12
1.4.	Actividades biológicas	15
1.4.1.	Efectos citotóxicos	15
1.4.2.	Efectos antioxidantes	18
1.4.3.	Efectos antiinflamatorios.....	19
1.5.	<i>Cissampelos pareira</i> L.	25
1.6.	<i>Nectandra angustifolia</i> (Schrad.) Nees & Mart.	26

1.1. Valorización de los productos naturales en el NEA

En la actualidad, el valor de las plantas en la medicina tradicional está siendo ampliamente considerado, en parte como respuesta a una revalorización de “*lo natural*” en consonancia con tendencias globales en este sentido, pero además, debido al extenso conocimiento ancestral existente en la región (Cruz-Pérez et al., 2021). Internacionalmente, la OMS ha respaldado este interés de búsqueda avalando e incentivando el análisis crítico de sus propiedades biológicas¹, cuya posible confirmación o refutación podría validar estas tradiciones (*Etnomedicina*)². Como resultado, esto ofrecería medicamentos basados en productos naturales a las comunidades con menos recursos económicos o aquellas alejadas de los centros de salud convencionales, y permitiría investigar nuevos compuestos efectivos para el tratamiento de una amplia gama de patologías con posibles efectos secundarios reducidos.

Desde esta perspectiva, la región del Nordeste Argentino (NEA), que abarca las provincias de Misiones, Corrientes, Chaco y Formosa, es una zona con una rica biodiversidad. Los ecosistemas presentes, como la Selva Paranaense³, los Esteros del Iberá y el Gran Chaco, albergan una gran cantidad de especies vegetales con potencial para diversos usos. Esta región es una reserva única en el país por su diversidad edafológica y ecológica, que proporciona condiciones favorables para el desarrollo de especies vegetales con características y componentes aún no identificados, que podrían ser potenciales materias primas o fitofármacos.

Esta exploración sistemática con el objetivo de encontrar bioactivos que puedan ser utilizados en diversas aplicaciones, implica la identificación, recolección y aprovechamiento de recursos naturales, pero a su vez, genera la responsabilidad de preservar la biodiversidad local. Es vital que la explotación de los recursos naturales se realice de manera sostenible, permitiendo una recolección responsable, pero evitando al mismo tiempo la degradación del medio ambiente. Luego, el agregado de valor a esta materia prima, particularmente el que surge como consecuencia de la investigación científica, es el primer paso hacia el desarrollo local y nacional. Así, el aprovechamiento de las potencialidades de los productos naturales vegetales en el NEA representa una opción atractiva de sondeo, que de resultar positiva se adicionaría a las ya existentes y acrecentaría la bioeconomía regional con impacto directo en el desarrollo social.

Para lograr esto, la colaboración entre universidades, institutos de investigación y organismos gubernamentales es crucial. Así, en consonancia con líneas de investigación declaradas como prioritarias por el ex ministerio de ciencia y técnica (MinCYT) en su agenda de desarrollo territorial (fitomedicina), desde hace algunos años, el grupo de investigación se ha centrado en el estudio del uso de especies autóctonas de los Esteros del Iberá para validar sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales y alexitéricas en fitomedicina.

¹ <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241506096>

² La etnomedicina estudia las prácticas médicas tradicionales de diversas culturas, integrando el uso de plantas medicinales, rituales y creencias espirituales. Conserva el conocimiento ancestral, complementa la medicina moderna y promueve nuevas investigaciones.

³ <https://www.argentina.gob.ar/interior/ambiente/parquesnacionales/ecorregiones/selva-paranense>

En tal sentido, en la presente tesis se introduce el estudio de dos plantas regionales, *Nectandra angustifolia* (laurel amarillo) y *Cissampelos pareira* (abuta) hasta el presente poco estudiadas, desde una perspectiva multiparamétrica incluyendo estudios *in vitro* e *in vivo*. Los resultados encontrados aquí detallados, han de sentar las bases para un ulterior desarrollo biotecnológico incorporando las propiedades biológicas halladas en futuras preparaciones farmacológicas.

1.2. Productos Naturales. Definiciones y clasificación

La terminología productos naturales puede hacer referencia simplemente a productos de la naturaleza, como organismos, ya sean enteros o en partes, o a exudados o extractos de ellos. Sin embargo, en este caso se considerará una acepción al término relacionado con la química, definiendo así a los productos naturales como compuestos químicos puros aislados de plantas, animales o microorganismos. Para acotar aún más el término se considerarán solamente a los metabolitos secundarios producidos por un organismo vivo, cuyo tamaño molecular es pequeño ($<2000 \text{ g mol}^{-1}$) (Heinrich et al., 2018). Las primeras definiciones de metabolitos secundarios atendían a la observación de que carecían de relevancia para el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo, por lo que se los consideraba accesorios (Ramaroson et al., 2022). Sin embargo, esta definición no es acertada, ya que son metabolitos esenciales para el desarrollo al tener funciones microbicidas, fotoprotectoras, estabilizadoras e incluso en la transducción de señales (Ahlawat et al., 2023). Estos metabolitos presentan una distribución taxonómica diferencial por lo que se los utiliza en clasificaciones botánicas (quimiotaxonomía) (Mera et al., 2019). Las producciones intrínsecas de estos metabolitos en una especie dada, siempre se ven afectadas por el entorno, de tal manera que los factores edafoclimatológicos a los que se encuentra expuesta la planta modifican sus concentraciones (Ahlawat et al., 2023). Los productos naturales se obtienen a partir de cualquier fuente terrestre o marina, pero los últimos frecuentemente se apartan de la clasificación tradicional, y constituyen una rama comparativamente nueva frente a la fitoquímica (Heinrich et al., 2018). Tienen una utilidad importante en la farmacología al proveer de nuevas drogas, presentar estructuras o bloques sobre los cuales sintetizar nuevas moléculas, al indicar nuevos blancos de acción que permitan el diseño de análogos (Sarker & Nahar, 2012).

Los productos naturales abarcan diferentes familias de compuestos de muy variada naturaleza química. Para clasificar los compuestos mencionados se pueden utilizar diferentes criterios como la composición química (presencia de nitrógeno o no), solubilidad en solventes orgánicos o en agua, estructura química (presencia de anillos por ejemplo) o por la ruta metabólica (Mera et al., 2019). Por lo general la forma más utilizada es la de clasificación según la ruta metabólica, sin embargo una forma mixta de clasificación es la presentada por Heinrich y colaboradores, en donde agrupan todos los productos naturales según su origen biosintético y considera a los alcaloides como un grupo único diferenciado (Heinrich et al., 2018). De tal manera se tomará de base esta clasificación, a modo de introducción sintética de cada grupo para luego profundizar en el estudio de los flavonoides.

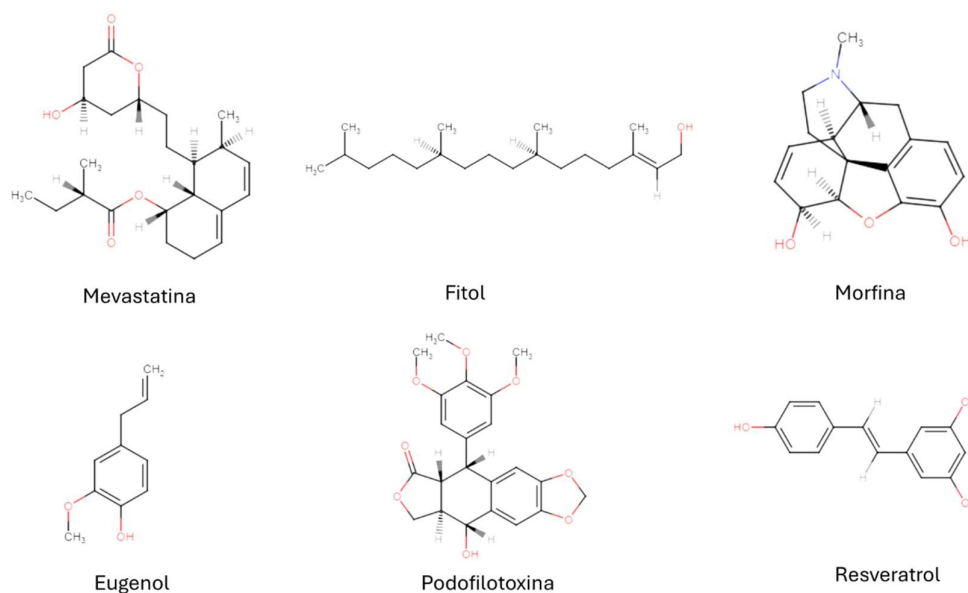


Figura 1.1. Representación esquemática de ejemplos nombrados dentro de las familias de productos naturales.

1.2.1. Policétidos

Son compuestos naturales que pueden presentarse en todos los organismos, pero principalmente se han descrito en bacterias, como el grupo de tetraciclinas y macrólidos. Estas familias de compuestos revisten gran importancia dada su actividad antimicrobiana (Ghareeb et al., 2020). El origen biosintético de estos compuestos se centra la ruta de condensación entre malonil-CoA y acetil-CoA, y por lo tanto también pueden incluirse dentro de este grupo a los ácidos grasos y glicéridos. Además, otro grupo de compuestos derivados de esta vía son las estatinas, usadas como inhibidores de hidroximetilglutaril-CoA en la síntesis del colesterol, las cuales han sido aisladas a partir de hongos, como la mevastatina (**Figura 1.1**) obtenida de *Penicillium citrinum* (Heinrich et al., 2018).

1.2.2. *Terpenos*

Se los conoce como isoprenoides o derivados del isopreno debido a la repetición en la estructura del esqueleto del 2-metil-1,3-butadieno, con estructuras que derivan en complejidad desde una simple cadena de 5 carbonos hasta poli-isoprenos de más de 40 carbonos. La ruta de biosíntesis proviene de las reacciones entre dimetilalilpirofosfato e isopentenilpirofosfato, por lo que los productos tendrán múltiplos de 5 carbonos. Se clasifican de acuerdo con el número de unidades isoprénicas. Poseen funciones variadas, con algunos exponentes presentes en funciones vitales del organismo, como el fitol (C20) (**Figura 1.1**) formando la cola de la molécula de clorofila (Bhatla, 2018). En el metabolismo secundario participan como moléculas de defensa, compuestos tóxicos, elementos disuasorios de insectos o como atrayentes de polinizadores (Mera et al., 2019).

1.2.3. *Alcaloides*

Los alcaloides son el grupo de productos naturales que mayor cantidad de contribuciones a la medicina e industria farmacéutica ha realizado. Su distribución es variada entre plantas, bacterias, hongos, insectos, anfibios y animales (Heinrich et al., 2018). En cuanto a la definición del grupo, son compuestos con anillo heterocíclico conteniendo nitrógeno, pero también se incluyen compuestos que tienen el nitrógeno en la cadena alifática (fenil alquil aminas) como la adrenalina o la efedrina. En plantas se pueden encontrar mezclas complejas de alcaloides y por lo general comparten la ruta biosintética dentro de dicha planta. La principal ruta de síntesis proviene de los aminoácidos, pero también existen incorporaciones del nitrógeno a otras moléculas. Las clasificaciones del grupo no son uniformes (Mera et al., 2019) y se encuentra fuera del alcance de la presente tesis discutir cada una de ellas. Como exponentes del grupo se pueden mencionar a atropina y la morfina (**Figura 1.1**).

1.2.4. *Derivados del ácido shikímico*

El ácido shikímico es el precursor de diversos compuestos naturales, incluyendo ácidos aromáticos (benzoico y gálico) y aldehídos aromáticos como vainillina. A partir de este precursor se formará fenilalanina, que por pérdida del amoníaco dará ácido cinámico. Este esqueleto de anillo aromático (C6) con una cadena de 3 carbonos (C3) dará origen a múltiples familias: fenilpropanos, lignanos, cumarinas y flavonoides (Heinrich et al., 2018).

Los fenilpropanos por lo general se obtienen por destilación con arrastre por vapor y forman parte de los aceites esenciales como el eugenol (**Figura 1.1**). Los lignanos son polímeros de bajo peso molecular formados a partir de la unión de dos fenilpropanos por su cadena lateral. Un exponente destacado es la podofilotoxina (**Figura 1.1**) que dio origen a análogos semisintéticos como los etopósidos, utilizados en el tratamiento del cáncer. Las cumarinas tienen una distribución limitada en las plantas, lo que las hace útiles para fines quimiotaxonómicos. Algunas de ellas, como la escopoletina, se sintetizan en respuesta a infecciones bacterianas o fúngicas. Además, estas

moléculas dieron origen a la síntesis de fármacos modernos, como la warfarina, derivada del dicumarol.

Los taninos son responsables por el amargor y astringencia de plantas y comidas, son compuestos polifenólicos de alto peso molecular que son solubles en agua. Comprenden dos grandes familias, los taninos hidrolizables que están formados por la esterificación de azúcares con ácidos fenólicos simples (derivados de la vía del ácido shikímico) y los no hidrolizables o también conocidos como taninos condensados que derivan de la polimerización de flavonoides.

El grupo de los flavonoides proviene biosintéticamente de dos vías, la del ácido shikímico y un fragmento de policétidos formado por 3 malonil-CoA, por lo tanto tienen una vía mixta de síntesis. Estos compuestos se describirán en el siguiente apartado ya que son el foco principal de esta tesis. Los estilbenos guardan relación con los flavonoides ya que se originan a partir de la misma unidad de tricétido pero con una descarboxilación (C6-C2-C6) y dentro de este grupo se encuentra el resveratrol (**Figura 1.1**).

1.3. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos naturales con una estructura común de dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos (C6-C3-C6), la cual se suele encontrar organizada en forma de un tercer anillo heterocíclico oxigenado en medio de los dos primeros (anillo C) (Leyva-López et al., 2016). La disposición del anillo B con respecto al anillo C da origen a tres clases diferentes: flavonoides (en sentido estricto), isoflavonoides y neoflavonoides (Panche et al., 2016; Rauter et al., 2018). Otros miembros de la familia de flavonoides, pero con estructura abierta (sin anillo C), incluyen las chalconas y auronas. Ejemplos de las estructuras se encuentran esquematizados en la **Figura 1.2**.

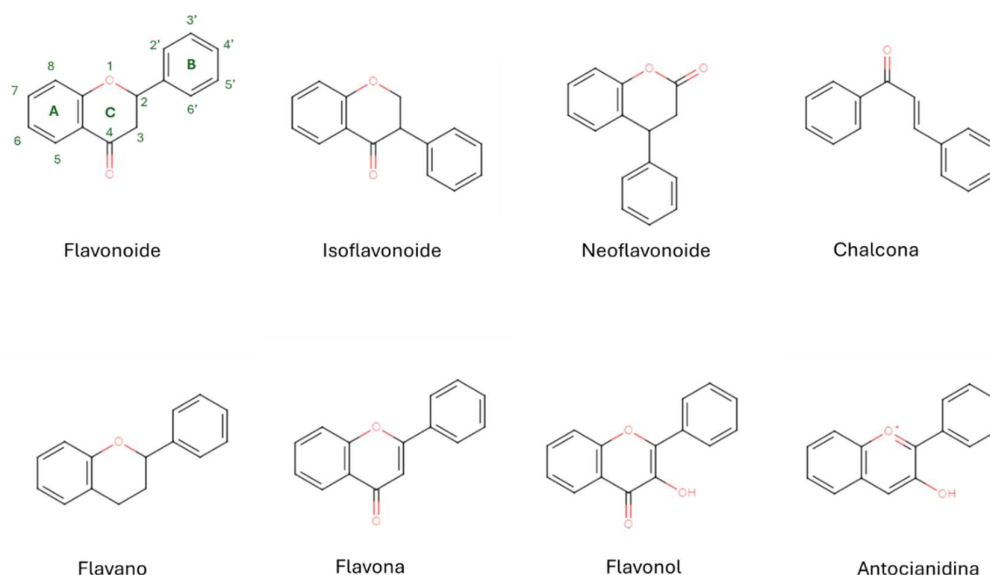


Figura 1.2. Representación esquemática de familias de flavonoides, posición de los anillos A, B y C en la estructura y numeración de la posición.

Los flavonoides en sentido estricto parten del esqueleto del flavano, las subfamilias de compuestos se dividen de acuerdo con las modificaciones del anillo C, la existencia de un doble enlace entre el carbono en posición 2 y 3 y la presencia de grupo carbonilo en posición 4 originan las flavonas y si a la misma estructura se incorpora un grupo hidroxilo en posición 3 se obtienen los flavonoles. La contraparte de estos compuestos, pero sin el doble enlace son las flavanonas y los flavanoles (Rauter et al., 2018). La presencia de dos dobles enlaces en el anillo C da origen a una carga positiva en el oxígeno del heterociclo, generando la familia de las antocianidinas y sus glicósidos (antocianinas) que frecuentemente son responsables de la pigmentación roja o púrpura de numerosas flores (Panche et al., 2016).

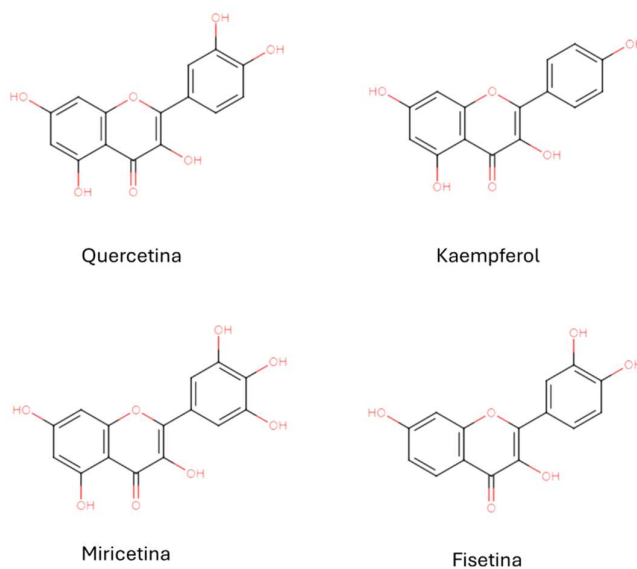


Figura 1.3. Representación de estructuras selectas de flavonoles.

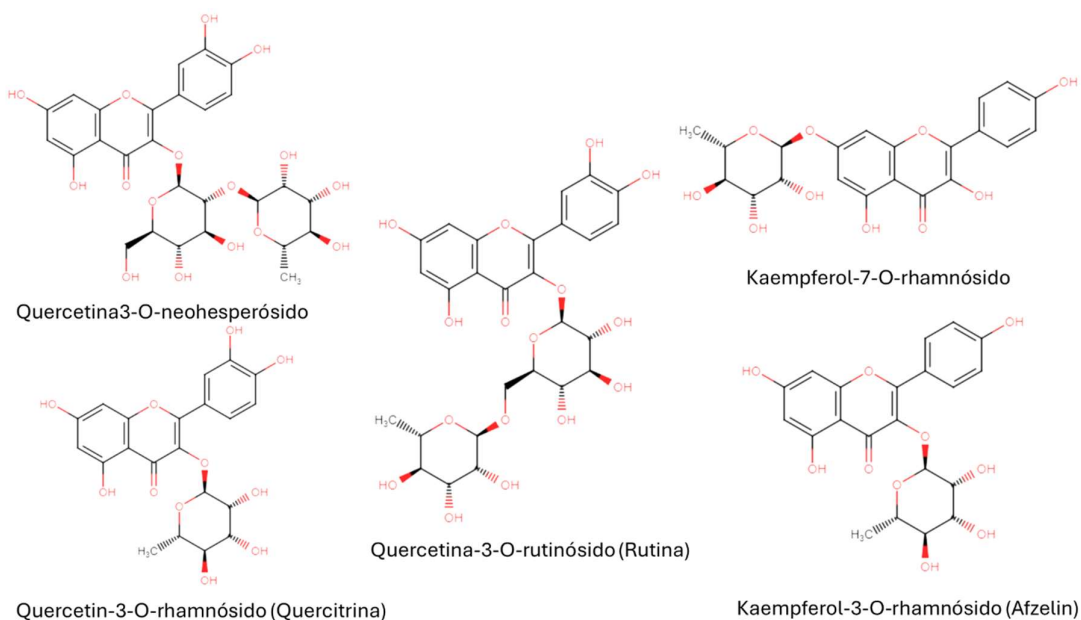


Figura 1.4. Ejemplos de formas glicosiladas de flavonoles entre paréntesis se aclaran otros nombres que reciben.

Probablemente los flavonoles sean el subgrupo de flavonoides más estudiados por su abundancia en frutas y vegetales (Panche et al., 2016). Las principales formas agliconas de este grupo son la quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina. Si bien los flavonoles pueden poseer diversos patrones de sustitución, un punto habitual de glicosilación en la naturaleza es el hidroxilo de la posición 3. Los residuos de azúcares más comúnmente encontrados son glucosa, galactosa, rhamnosa y ácido glucurónico (Mahmud et al., 2023).

Los flavonoides producen un espectro característico en el UV, dado por la presencia de dos absorciones máximas ($\lambda_{\text{máx}}$) correspondientes con el anillo aromático A (banda II) y con el anillo B del ácido cinámico (banda I). Este patrón cambia de acuerdo con la subfamilia de flavonoides y los sustituyentes presentes, representando así una forma de caracterización de los compuestos. Las absorbancias en $\lambda_{\text{máx}}$ de 240-285 nm corresponden a la banda II, mientras que las de comprendidas entre 300 y 400 nm son atribuibles a la banda I (Markham & Mabry, 1975). Además de la variación en la longitud de onda, la forma del espectro de absorción también varía pudiéndose encontrar como un hombro o con dos picos en lugar de un solo pico, en particular cuando se presentan sustituciones (di-, tri- u o-) en el anillo B (Kumar & Pandey, 2013).

La estructura base de C6-C3-C6 representa un lienzo donde la naturaleza puede plasmar su creatividad a la hora de incorporar sustituyentes. De tal manera se pueden encontrar flavonoides con grupos hidroxilo, metilo, metoxilo, acilo, cadenas isoprenílicas, entre otros y una diversidad de glicosilaciones. Estas uniones glucídicas se pueden dar tanto como C-glicósidos u O-glicósidos, sobre grupos hidroxilos, y pueden presentarse como mono-, di- o polisacáridos. En general cualquier grupo hidroxilo estaría disponible para glicosilaciones, sin embargo para uniones O-glicósídicas los sustituyentes se incorporan en la posición 7- para flavonas, flavanonas e

isoflavonas; posiciones 3-/7- en flavonoles y flavanoles; posiciones 3- / 5- en antocianidinas (Hiromoto et al., 2015). Para sustituciones C-glicosídicas en general se ubican en las posiciones 6- / 8- del anillo A (Yang, B. et al., 2018).

La glicosilación de flavonoides mejora su solubilidad y estabilidad en agua, este efecto depende del azúcar agregado. Por lo general las glicosilaciones y galactosilaciones mejoran la solubilidad en agua mientras que los residuos rhamnósidos la disminuyen (Slámová et al., 2018). Las glicosilaciones disminuyen la capacidad antioxidante de los flavonoides al bloquear algunos grupos hidroxilo (Heim et al., 2002).

En estudios de absorción de flavonoides con la dieta se encontró que las formas glicosiladas no se absorben con facilidad en el intestino, por lo que su concentración en plasma es relativamente baja. No obstante, los microorganismos de la flora intestinal son capaces de metabolizar y liberar formas agliconas que si ingresan con mayor facilidad al organismo (Yang, B. et al., 2018). En estudios de absorción utilizando células CaCo-2 (línea de intestino humano) se comprobó que las glicosilaciones disminuyen la absorción en comparación con las formas agliconas, y esta disminución es aún mayor en el caso de diglicósidos (Zhang et al., 2020).

La extracción con solventes es comúnmente utilizada para la obtención de flavonoides desde plantas molidas, los solventes más utilizados incluyen agua, etanol, metanol o mezclas de estos (Heinrich et al., 2018). Las técnicas de análisis deben lidiar con la separación a partir de matrices complejas por lo que el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como paso previo es ampliamente utilizada. La fase estacionaria comúnmente es de fase reversa C8 o C18 y el uso de fase móvil acuosa modificada débilmente ácida y una segunda fase orgánica de metanol o acetonitrilo (Bligh et al., 2013). El pH de la fase móvil influye en la retención de los flavonoides en la columna dependiendo de la protonación, un incremento del pH favorece la ionización por lo que reduce la interacción con una fase reversa no polar, como la C18 y conduce a tiempos de retención menores con picos no definidos (Stefova et al., 2003). Para mejorar la resolución se adicionan pequeñas cantidades de ácido que supriman la ionización de grupos fenólicos o carboxílicos. Los sistemas de detección usualmente empleados incluyen detector UV-vis o espectrómetro de masas.

1.4. Actividades biológicas

Si bien existen numerosas actividades biológicas descritas para los flavonoides, en esta tesis se hará foco en tres de ellas. Por lo cual en los siguientes apartados se hará una breve reseña del estado del arte para cada una de estas y su relación con los compuestos mencionados.

1.4.1. Efectos citotóxicos

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales que pueden invadir y dañar los tejidos circundantes y diseminarse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático o sanguíneo. En la actualidad se entiende que crecimiento anómalo es el resultado de mutaciones genéticas que alteran la regulación normal del ciclo celular,

permitiendo que las células escapen de los mecanismos naturales de control del organismo, tales como la apoptosis (u otros mecanismos de muerte celular programada) y el ciclo de reparación del ADN (Hanahan & Weinberg, 2011). Adicionalmente a su vez, el sistema inmunitario tiene un papel esencial en la vigilancia del cáncer, detectando y eliminando células anormales mediante un proceso llamado inmunovigilancia. Sin embargo, las células tumorales pueden evadir este control a través del proceso de inmunoeedición, que incluye tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2004; Vesely & Schreiber, 2008). En la fase de eliminación, el sistema inmune logra eliminar la mayoría de las células cancerosas. En el equilibrio, las células sobrevivientes permanecen latentes, bajo control inmunológico y pueden eliminarse; o bien finalmente, en la fase de escape, las células tumorales mutan para evitar la detección, utilizando estrategias como la pérdida de antígenos, la secreción de factores inmunosupresores (TGF- β , IL-10) y la expresión de proteínas inhibitorias como PD-L1, lo que bloquea la respuesta de los linfocitos T (Pardoll, 2012). Además, la inflamación crónica puede contribuir al desarrollo del cáncer, proporcionando un ambiente favorable para la proliferación celular, la mutación y la angiogénesis. En este punto, es fácil ver que inflamación y cáncer están mutuamente relacionados, concepto que se desarrollara en el próximo ítem de esta introducción. No obstante, por lo anterior, la generación de un ambiente antiinflamatorio e inmunosupresor, a su vez facilita la aparición o supervivencia de células tumorales. Por lo que el entendimiento de cuáles son las características del microambiente tisular que favorece la aparición o eliminación de células tumorales no es simple de modelar, y es actualmente tema muy activo de discusión e investigación.

Los tratamientos tradicionales del cáncer incluyen naturalmente la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Cada una de estas estrategias presenta ventajas en términos de su efectividad para reducir el tamaño del tumor o erradicar células cancerosas. No obstante, también tienen limitaciones importantes. La cirugía es eficaz en los casos en que el tumor es accesible y no se ha diseminado. Sin embargo, no puede tratar la enfermedad metastásica y conlleva riesgos asociados a la intervención, como infecciones y complicaciones postoperatorias (Vogelstein et al., 2013). La radioterapia utiliza radiación de alta energía para destruir células cancerosas, pero aunque es un tratamiento localizado, puede dañar también tejidos sanos cercanos al tumor, causando efectos secundarios como fatiga, irritación cutánea y daño a órganos próximos (De Ruyscher et al., 2019). Finalmente, la Quimioterapia consiste en el uso de fármacos que interfieren con la división celular, afectando tanto a las células cancerosas como a las sanas. Esto provoca efectos adversos como náuseas, inmunosupresión, caída del cabello y fatiga severa. Además, la resistencia adquirida a los fármacos y la toxicidad acumulada limitan su efectividad a largo plazo (Holohan et al., 2013).

Dado que estas limitaciones subrayan la necesidad de desarrollar tratamientos más eficaces y menos agresivos, y reconociendo el rol del sistema inmune en la aparición de tumores, en la última década la inmunoterapia ha tenido un crecimiento extraordinario a pesar de sus costos para el sistema de salud. La inmunoterapia es una estrategia emergente en el tratamiento del cáncer que busca potenciar la capacidad del sistema inmunitario para reconocer y destruir células

tumorales. A diferencia de los tratamientos convencionales que atacan directamente las células cancerosas, la inmunoterapia modula la respuesta inmunitaria del paciente para superar los mecanismos de evasión desarrollados por los tumores (Pardoll, 2012). Uno de los enfoques más exitosos es el uso de inhibidores de puntos de control inmunitario, como los anticuerpos que bloquean PD-1 o PD-L1, permitiendo que los linfocitos T reconozcan y destruyan las células tumorales (Topalian et al., 2015). Estos tratamientos han mostrado resultados prometedores en cánceres como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer renal. Sin embargo, no todos los pacientes responden a la inmunoterapia, y algunos experimentan efectos adversos relacionados con la activación excesiva del sistema inmunitario. Otra estrategia es la terapia con células T modificadas genéticamente, como los receptores de antígenos quiméricos (CAR-T), que han sido eficaces en ciertos cánceres hematológicos (Maude et al., 2018) o el uso de anticuerpos monoclonales (Beck et al., 2010). Aunque la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer, aún enfrenta desafíos, como la resistencia adquirida y la identificación de biomarcadores que predigan la respuesta del paciente (M. Yang et al., 2024).

Debido en gran parte a las inaceptables toxicidades de los quimioterapéuticos convencionales, que presentan un índice terapéutico limitado por la escasa diferencia entre la dosis efectiva y la dosis tóxica, los compuestos naturales (dentro de ellos los flavonoides) se han convertido en una alternativa atractiva, al constituir un valioso reservorio para su exploración (Hasnat et al., 2024; Moghaddam et al., 2012). En tal sentido, solo por mencionar algunos ejemplos, en cáncer de mama, flavonoides como la quercetina y el kaempferol han mostrado inhibir la proliferación de células cancerosas. La quercetina induce apoptosis y modula vías de señalización clave en el crecimiento tumoral (vías de PI3K/AKT, MAPK y la movilización de ácido araquidónico) (Tang et al., 2023), mientras que el kaempferol inhibe el crecimiento celular a través de la regulación de factores de crecimiento y la reducción de la angiogénesis (Imran et al., 2019). Similares estudios han demostrado que la silibinina, un flavonoide derivado del cardo mariano, reduce la proliferación de células de cáncer de próstata, induce apoptosis y modula vías de señalización inflamatoria, mostrando efectos antitumorales prometedores (Singh et al., 2008). Otra revisión muy reciente, demuestra que la epigallocatequina galato, un flavonoide del té verde, ha demostrado eficacia en la inhibición del crecimiento y la invasión de células tumorales, principalmente a través de la modulación de la apoptosis y la inhibición de metástasis. Notablemente, muchos trabajos muestran vías precisas de interferencias de este flavonoide con vías de señalización características distintivas del cáncer (Talib et al., 2024).

Estas propiedades descriptas para los flavonoides y la disposición de extractos ricos en los mismos motivan la exploración de la actividad citotóxica de los extractos enteros contra diversas líneas tumorales humanas como punto de partida en la investigación de fármacos antitumorales.

1.4.2. Efectos antioxidantes

Un antioxidante se puede definir como cualquier sustancia que retrasa, previene o revierte el daño oxidativo en una molécula blanco. No existe un antioxidante universal ideal, ya que las reacciones involucran distintos compuestos, ocurren en diferentes ubicaciones y protegen varios blancos moleculares (Murphy et al., 2022). La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos está ampliamente descrita en la bibliografía, y entre ellos, los flavonoides cuentan con una gran cantidad de evidencia sobre su capacidad para captar radicales libres y especies reactivas de oxígeno en general (Mladěnka et al., 2010).

Los métodos empleados para la determinación *in vitro* se basan en general en dos líneas, la prevención de la descomposición de radicales (DPPH o ABTS) o en la captación de iones metálicos Fe (FRAP) o Cu (CUPRAC) (Sadeer et al., 2020). La utilidad de estos ensayos proviene de la facilidad de realización e interpretación, permitiendo el discernimiento entre compuestos con mayor poder antioxidante, que dependerá del método utilizado. Ahora, la traslación de esos resultados *in vitro* a medios biológicos es cuestionable ya que no se replican condiciones biológicas, por ejemplo, en el caso de los compuestos radicalarios (DPPH o ABTS) estos tienen una vida mayor a los intervinientes en las reacciones de estrés oxidativo celular. Además, la complejidad del estudio en células añade toda la maquinaria de defensa celular, el medio de reacción y los diferentes blancos del daño oxidativo (Murphy et al., 2022).

En células, los compuestos antioxidantes pueden actuar básicamente a través de dos mecanismos, como captadores de radicales directos o estimulando la defensa antioxidante. El factor de transcripción más estudiado que explica los efectos en la actividad antioxidante celular es Nrf2 (factor nuclear tipo eritroide 2), el cual en condiciones de homeostasis se encuentra asociado con Keap1, esto hace que se ubiquitine y elimine a través del proteasoma. Sin embargo, al censar un estrés por especies reactivas del oxígeno o por electrófilos, se disocia de Keap-1 y transloca al núcleo donde ejerce su efecto al estimular la transcripción de genes de respuesta antioxidante (ARE) entre los cuales se encuentran HO-1 (Hemooxigenasa-1), NQO1 (NADPH quinona oxidoreductasa 1) y GSTA (Glutathión s-transferasa) involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo (Ahmed et al., 2017). Un esquema de esta vía se puede observar en la **Figura 1.5**. En particular HO-1 se induce en respuesta a diferentes estímulos, como hipoxia, inflamación, metales pesados, y representa una estrategia celular aceptada para neutralizar esa variedad de condiciones de estrés. Estas características hacen que la identificación de inductores de HO-1 sean un blanco terapéutico interesante para combatir respuestas oxidativas e inflamatorias. Numerosos compuestos naturales como flavonoles, flavonas e isoflavonas han sido identificados como activadores de Nrf2 (Kumar et al., 2014) e incluso se han realizado estudios de relación estructura actividad de dicha activación (Li et al., 2018).

El estrés oxidativo se encuentra asociado a múltiples enfermedades que padece la humanidad en la actualidad, ya sea participando en el origen o como la progresión de las mismas. En particular en enfermedades neurodegenerativas, el exceso de estrés oxidativo conduce a la

muerte de células del sistema nervioso asociándose así con la progresión de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson o Huntington (Loboda et al., 2016). A su vez, el factor de transcripción Nrf2 tiene control sobre puntos clave de la regulación de la respuesta inmune, como la vía de señalización de NF- κ B, lo que establece un punto de unión entre este factor y la inflamación (van der Horst et al., 2022).

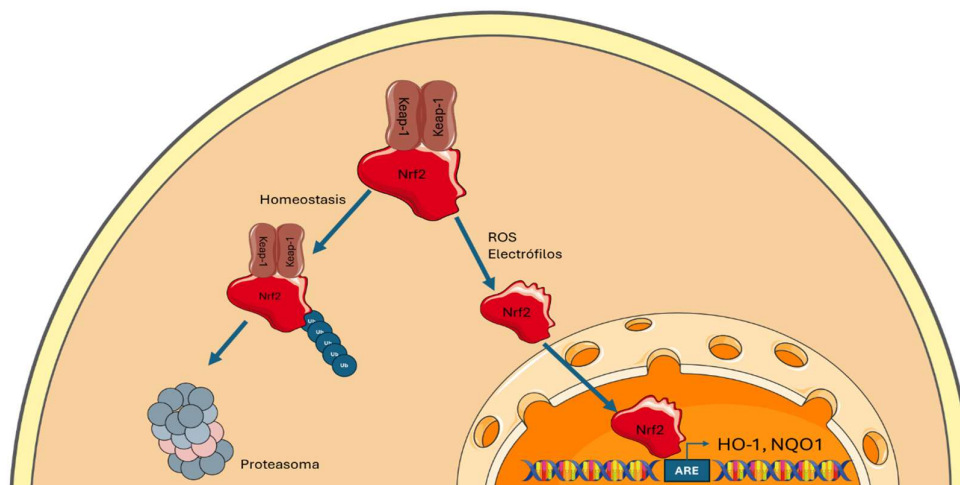


Figura 1.5. Representación esquemática del funcionamiento del factor de transcripción Nrf2 en la regulación de genes involucrados en la respuesta antioxidante celular. Adaptación de Saha y colaboradores. (Saha et al., 2020).

1.4.3. Efectos antiinflamatorios

La inflamación es una respuesta protectora del organismo contra desafíos serios a la homeostasis, como infecciones, injurias y estrés de tejidos. Las señales inflamatorias inducen una infinidad de cambios en diversos procesos biológicos desde respuestas vasculares locales hasta cambios en la temperatura corporal, estas señales incluyen citoquinas, quimiocinas, aminas bioactivas y eicosanoides (Kotas & Medzhitov, 2015). La descripción de la inflamación se remonta a la antigüedad, con las primeras definiciones aportadas por Celso en tiempos del imperio romano, quien identificó cuatro signos clásicos de la inflamación: enrojecimiento, hinchazón, fiebre y dolor. A estos se añadió posteriormente un quinto elemento, la pérdida de función del órgano (Cavaillon, 2021). La inflamación también abarca la respuesta frente a células muertas o dañadas, sin estar necesariamente vinculada a una infección, así como la acumulación de sustancias anormales en células y tejidos. Durante una inflamación aguda, los leucocitos circulantes y las proteínas plasmáticas son transportados hacia los sitios afectados en los tejidos, donde se activan para destruir y eliminar los agentes agresores. Este proceso es beneficioso para la defensa del organismo; sin embargo, si se prolonga en el tiempo, puede volverse perjudicial (Abbas et al., 2021). Las citoquinas TNF α , IL-1 β e IL-6 que se producen durante la respuesta innata tienen efectos sistémicos como fiebre, leucocitosis y estímulo de reactantes de fase aguda, estos tienen un aspecto positivo en el mecanismo de defensa como también negativo en el cuerpo. En particular TNF α tiene

actividades patológicas al encontrarse en grandes concentraciones en plasma ya que inhibe la contractibilidad miocárdica y el tono vascular del músculo liso, también lleva a la producción de trombosis intravascular al disminuir las propiedades normales anticoagulantes del endotelio (Abbas et al., 2021). Otro efecto deletéreo de la respuesta inmune se da por los mecanismos efectores de los leucocitos en la eliminación de bacterias. Los niveles aumentados de especies reactivas del oxígeno y de óxido nítrico resultan tóxicos para el tejido.

La incapacidad de resolver la inflamación da lugar a patologías relacionadas con la inflamación crónica, como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, artritis reumatoide y cáncer. En estos casos, la inflamación persistente contribuye al daño tisular, la disfunción orgánica y la progresión de la enfermedad. Además, la inflamación no resuelta puede desencadenar una respuesta inmunitaria descontrolada, exacerbando los efectos deletéreos en el organismo al alterar la homeostasis celular y los procesos de reparación del tejido (Leuti et al., 2020).

En el proceso inflamatorio se ven involucrados numerosos tipos celulares, desde las propias del sistema inmune a células endoteliales o fibroblastos y otras del tejido conectivo, que liberan patrones moleculares asociados al daño (DAMP). Dentro de las células de la inmunidad existen células residentes en el tejido que serán las primeras en procesar la señal y reclutar al foco de daño a neutrófilos y monocitos. Interesantemente, los macrófagos residentes y los monocitos comparten características comunes al formar parte del mismo linaje celular: el sistema mononuclear fagocítico. No obstante, los monocitos extravasados que se diferencian en macrófagos en el tejido tienen un perfil fenotípico distintivo. Los macrófagos son entonces células muy interesantes de estudiar desde el punto de vista inflamatorio ya que participan desde el inicio de la inflamación hasta su resolución (Ginhoux & Jung, 2014).

Los macrófagos humanos se pueden caracterizar por la expresión de diversos marcadores de superficie celular, como CD14, CD68, CD163 y CD206, entre otros; mientras que los macrófagos murinos presentan un perfil de marcadores ligeramente diferente, destacando la expresión de F4/80, CD11b y CD68, entre otros. Estos marcadores permiten distinguir entre diferentes subpoblaciones de macrófagos y estudiar sus funciones en el contexto de distintos modelos experimentales o patologías asociadas (Murray, 2017; Murray et al., 2014; Murray & Wynn, 2011).

Otra peculiaridad remarcable de estas células es su plasticidad funcional, y su capacidad de expresión de marcadores en contextos muy disímiles que van desde un extremo reactivo proinflamatorio hasta el otro polo resolutivo (Mantovani et al., 2013; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Los macrófagos M1, también conocidos como macrófagos "clásicamente activados", se generan en respuesta a señales proinflamatorias, como el interferón gamma (IFN γ) y el lipopolisacárido (LPS). Su principal función es promover una fuerte respuesta inflamatoria, lo que los hace eficaces en la eliminación de patógenos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos M1 producen grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina-1 beta (IL-1 β) y óxido nítrico (NO), lo que ayuda a amplificar la

respuesta inmunitaria. Además, están asociados con la expresión de marcadores como CD80, CD86 y la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) (Nonnenmacher & Hiller, 2018).

En el otro polo del espectro, los macrófagos M2, o "alternativamente activados", se desarrollan en respuesta a estímulos antiinflamatorios, como la interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-13 (IL-13). Estos macrófagos desempeñan un papel crucial en la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos, promoviendo la homeostasis tisular. Los M2 producen citoquinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), y favorecen la cicatrización y la remodelación del tejido dañado. También se caracterizan por la expresión de marcadores como CD206 (receptor de manosa), CD163 y la arginasa-1 (Arg1), **Figura 1.6 A** (Odegaard & Chawla, 2011; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

La distinción entre los macrófagos M1 y M2 resalta su dualidad funcional: los M1 están más asociados con respuestas proinflamatorias y la eliminación de patógenos, mientras que los M2 están implicados en la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos. Esta plasticidad permite que los macrófagos adapten su función según el contexto inmunológico, aunque un desequilibrio en su polarización puede contribuir a enfermedades crónicas, como infecciones persistentes, cáncer o fibrosis. Esta idea de polarización y su nomenclatura M1 – M2 fue propuesta por Mills, y recuerda la dicotomía Th1 y Th2 de los Linfocitos T CD4⁺ (Mills, 2012, 2015; Mills et al., 2000). No obstante, otras citoquinas y factores, como IL-10, TGFβ y los glucocorticoides, no encajan claramente dentro del contexto de la respuesta Th1/Th2, pero inducen fenotipos similares a los macrófagos M2 (Martinez & Gordon, 2014). Considerando la participación de los M2 en una variedad de funciones, como las respuestas de tipo II, la inmunorregulación y la remodelación tisular, Mantovani y colaboradores sugirieron subclasificar los tipos específicos de M2 como: M2a (activados por IL-4 o IL-13; 'a' de alternativa), M2b (estimulados por la exposición a inmunocomplejos y agonistas de TLR/IL-1R) y M2c (desencadenados por IL-10 y glucocorticoides) (Mantovani et al., 2004). Posteriormente, el grupo de Leibovich introdujo a los macrófagos M2d, inducidos por agonistas del receptor de adenosina A2A y agonistas de TLR, exhibiendo un fenotipo distinto caracterizado por la supresión de citoquinas inflamatorias y la elevación de VEGF e IL-10, lo que demuestra la complejidad de la clasificación de los macrófagos (Ferrante et al., 2013; Ferrante & Leibovich, 2012) **Figura 1.6 B**.

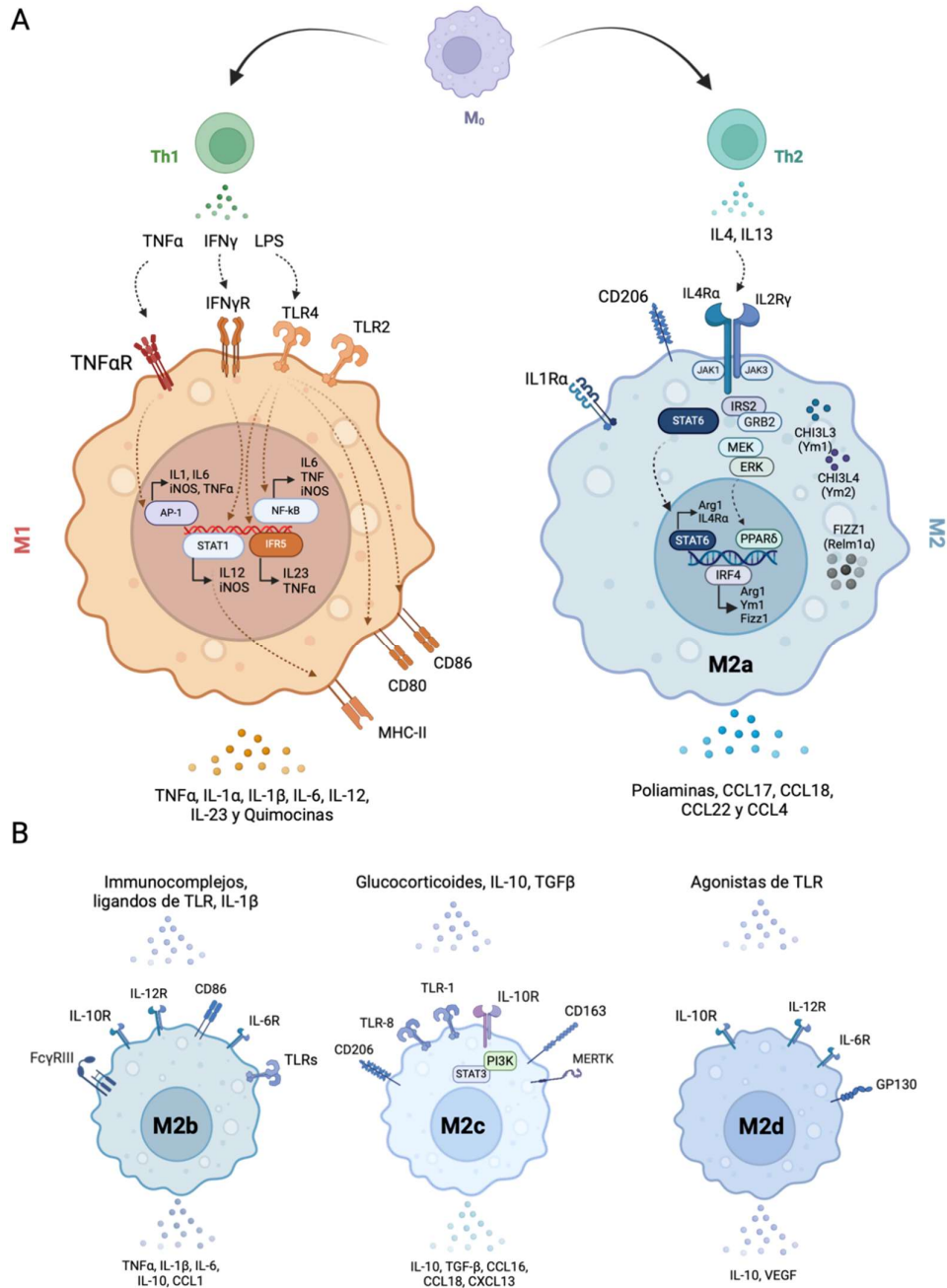


Figura 1.6. Espectro fenotípico de macrófagos en diferentes esquemas experimentales. Al activarse por LPS y citoquinas Th1 (IFN γ y TNF α), los macrófagos se polarizan hacia el fenotipo M1, caracterizado por los marcadores de superficie TLR-2, TLR-4, CD80, CD86, iNOS y MHC-II. Los macrófagos M1 liberan citoquinas y quimiocinas (TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL9 y CXCL10), reclutando más macrófagos al estado M1. Factores de transcripción como NF- κ B y STAT1 regulan la expresión génica de M1, lo que conduce a funciones microbicidas y tumoricidas. La polarización M2 responde a citoquinas como IL-4, IL-13 (M2a), agonistas de TLR, IL-10, glucocorticoides y TGF β , entre otros estímulos que definen subtipos específicos de M2. Solo IL-4 e IL-13 inducen directamente la activación de M2, mientras que los demás la amplifican. Los marcadores de M2 incluyen el receptor de manosa (CD206), CD163 (receptor de alta afinidad para hemoglobina-haptoglobina), FIZZ1 y Ym1/2, junto con citoquinas y quimiocinas sobreexpresadas. Factores de transcripción como STAT1 o STAT6 regulan la expresión génica de M1 y M2, respectivamente, contribuyendo a la prevención de infecciones, la reparación de tejidos, la angiogénesis y la inmunomodulación (He et al., 2021; L. Xun Wang et al., 2019; Yao et al., 2019; Zhang y Sioud, 2023).

Aunque esta clasificación fenotípica y funcional exhaustiva podría no existir *in vivo*, el paradigma de la polarización ha sido ampliamente aceptado y resulta útil para distinguir características inmunitarias críticas de los macrófagos (Biswas & Mantovani, 2010).

Como se ha mencionado, existen distintos tipos de origen de la inflamación, pero un modelo tradicional incluye el ingreso de una noxa, por ejemplo, una bacteria que será reconocida por el sistema inmunitario. En tal sentido las bacterias Gram negativas poseen en su estructura de membrana externa compuestos altamente conservados, como el lipopolisacárido (LPS) (Romero Hurtado & Iregui, 2010). El LPS con ayuda de las moléculas CD14 y MD-2 se une al receptor de tipo Toll 4 (TLR-4) y produce su dimerización (Park & Lee, 2013). Esta dimerización induce el reclutamiento de adaptadores TIRAP-MyD88. MyD88 reclutará a las quinasas asociadas a IL-1R (IRAK) 4 y 2. Este acoplamiento de IRAK4, IRAK2 y MyD88 también recibe el nombre de Myddosoma, posteriormente activan a IRAK1 que se asocia con el factor asociado al receptor de TNF 6 (TRAF6) que activa las quinasas del I κ B (IKK) y la vía de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) (Rocha et al., 2016). La activación de las quinasas IKK lleva a la fosforilación de las proteínas inhibitorias I κ B y a la consecuente activación de NF- κ B (Hayden & Ghosh, 2008), que transloca al núcleo ejerciendo la estimulación de genes inflamatorios de las proteínas COX-2, TNF α , IL-1 β , IL-6, iNOS, entre otros. La vía de las MAPK se encuentra compuesta por p38, JNK y ERK que llevan a la fosforilación y activación de AP-1. Este factor nuclear también participa en la inducción de genes inflamatorios (Fujioka et al., 2004; Rocha et al., 2016). La representación esquemática de esta vía se puede observar en la **Figura 1.7**.

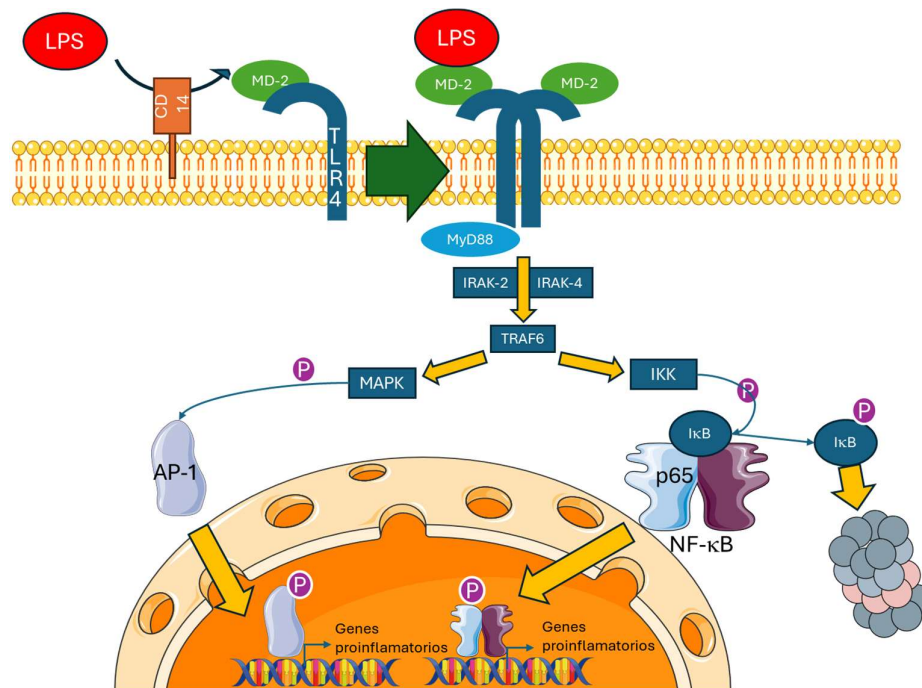


Figura 1.7 Representación esquemática de la transducción de la señal del lipopolisacárido (LPS) a través de receptor de tipo toll 4 (TLR4). Nótese las vías paralelas de señalización (MAPK y NF- κ B) disparadas coexistentemente por un mismo estímulo proinflamatorio. Imagen de diseño propio según lo propuesto por diferentes autores (Hayden & Ghosh, 2008; Park and Lee, 2013; Rocha et al., 2016).

La transcripción de genes inducida por LPS y su traducción a proteínas conllevará al aumento de las citoquinas proinflamatorias y de enzimas involucradas en este proceso como lo son COX-2 e iNOS. En particular la estimulación de la óxido nítrico sintasa inducible conlleva a una producción exacerbada de óxido nítrico, lo cual lo convierte en un biomarcador útil para la detección del proceso (Dirsch et al., 1998).

La inflamación clásica que involucra la respuesta descripta puede aplicarse al sistema nervioso central (SNC) en patologías donde existe una infección viral o bacteriana que lo comprometa. En estos casos se producirá la acumulación de células inmunes reclutadas desde el torrente sanguíneo, sin embargo existen patologías que no se adaptan del todo a los términos inflamatorios descritos como la encefalopatía de Creutzfeldt-Jakob, cuyo diagnóstico requiere ausencia de marcadores inflamatorios clásicos pero cuenta con un aumento marcado de MHC-II en las células de la glía (Graeber et al., 2011). Las respuestas inflamatorias a nivel del SNC son diferentes a la de los tejidos periféricos y en gran parte esta discrepancia se debe a las células involucradas. Las células de la glía actúan de manera coordinada, incluyendo a los astrocitos, microglía, oligodendrocitos y células NG2. De estos tipos celulares la microglía son las células residentes del sistema inmune innato en el SNC y son las que primero se activan ante estímulos peligrosos o estados patológicos (Q. qiao Yang & Zhou, 2019). Estas células pueden permanecer activas durante períodos extensos, liberando citoquinas y moléculas neurotóxicas que contribuyen a la neurodegeneración incluso las microglías activadas son capaces de destruir neuronas. Por esto, resulta un blanco atractivo de estudio, la inhibición de la respuesta proinflamatoria en microglías activadas para mitigar el progreso de enfermedades neurodegenerativas (Shabab et al., 2017).

Existen dos tipos principales de drogas antiinflamatorias, las no esteroideas (también conocidas como NSAID por sus siglas en inglés) y los inhibidores de citoquinas. Todos los NSAID tienen reportes de incremento del daño gastrointestinal por la acción inhibitoria sobre COX-1, además de complicaciones renales y cardiovasculares (Wirth et al., 2024). Los inhibidores de citoquinas, como el Tocilizumab (anti IL-6 receptor), poseen un costo elevado y no están libres de efectos adversos por lo que es imperativo encontrar terapias alternativas para tratar enfermedades inflamatorias (Leyva-López et al., 2016). En este sentido los compuestos naturales presentan una opción atractiva de estudio. Los flavonoides, en particular, han demostrado un amplio rango de actividades antiinflamatorias debido a su capacidad para inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF α , IL-1 β y IL-6, así como la expresión de COX-2 e iNOS. Además ya se mencionó su remarcable efecto antioxidante, que contribuye a reducir el estrés oxidativo, un factor clave en el desarrollo de la inflamación crónica (Astudillo et al., 2023). El creciente interés en los flavonoides como terapias antiinflamatorias también se debe a su perfil de seguridad, ya que, en general, presentan menos efectos adversos en comparación con los medicamentos convencionales (Hamsalakshmi et al., 2022). Sin embargo, es necesario acrecentar la investigación en sus efectos celulares para comprender mejor su biodisponibilidad, dosis efectiva y mecanismos específicos de

acción, con el objeto de desarrollar estrategias que permitan su uso clínico de manera segura. En tal sentido esta tesis pretende generar conocimiento al respecto.

1.5. *Cissampelos pareira* L.

El género *Cissampelos* pertenece a la familia Menispermaceae, las especies de este género se caracterizan por ser enredaderas herbáceas y presenta una distribución global amplia (da Silva Mendes et al., 2020). *Cissampelos pareira* responde a esta distribución tal como se puede observar en la **Figura 1.8**. Es una enredadera perenne, trepadora, que se suele levantar entre 2 y 5 m del suelo y encontrarse cerca de cursos de agua. Su tallo es delgado y flexible, encontrado en el suelo o alrededor de algún soporte. Las hojas son membranosas, simples, las venas en ella se esparcen desde la base y la forma de las hojas va de ovalada a corazonada (Kumari et al., 2021). El nombre tradicional utilizado es “Abuta” y posee una amplia variedad de usos reportados (Semwal et al., 2014).



Figura 1.8. A. Mapa de distribución de la especie *C. pareira* alrededor del mundo. Figura obtenida de World Flora Online⁴. B. Fotografía de un ejemplar de *C. pareira*.

De acuerdo con una revisión reciente, sustancias de la familia de los alcaloides se han descrito como principales componentes de las raíces de esta especie. En cambio, para las partes aéreas predominan las sustancias de la familia de flavonoides (Kumari et al., 2021). En los usos tradicionales de las hojas se pueden encontrar como antídoto para mordeduras de víbora (Giovannini & Howes, 2017) y usado para inflamación muscular e infecciones de piel (Zamora-Martínez & de Pascual Pola, 1992), así como también para malestares digestivos y heridas de pie diabético (Méndez-González et al., 2014).

En particular, descripciones como el uso de la planta para el tratamiento de accidentes ofídicos, como el caso reportado en Costa Rica donde una infusión acuosa al 10% de la planta entera demostró actividad antiproteolítica y antihemorrágica contra el veneno de *Bothrops asper*

⁴ WFO (2024): *Cissampelos pareira* L. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000605874>.

(Badilla et al., 2008), motivaron al laboratorio a investigar esta especie en relación con los venenos locales de *Bothrops diporus* (Ricciardi Verrastro et al., 2018). Resultados previos de la Dra. Ricciardi, demostraron que el extracto etanólico de partes aéreas de *Cissampelos pareira* recogidas durante la estación de verano en Paso de la Patria, Corrientes, Argentina, fue capaz de inhibir las diferentes actividades tóxicas del veneno entero. Este extracto fue fraccionado y su análisis por espectrometría de masas mostró estructuras compatibles con quercetina-3-O-soforósido, naringenina-7-O- β -D-glucósido, eriodictiol-7-O- β -D-glucósido, galangina-7-glucósido y baicaleína-7-O-glucósido (oroxina A) (Ricciardi Verrastro et al., 2018). Estas estructuras se muestran en la **Figura 1.9**.

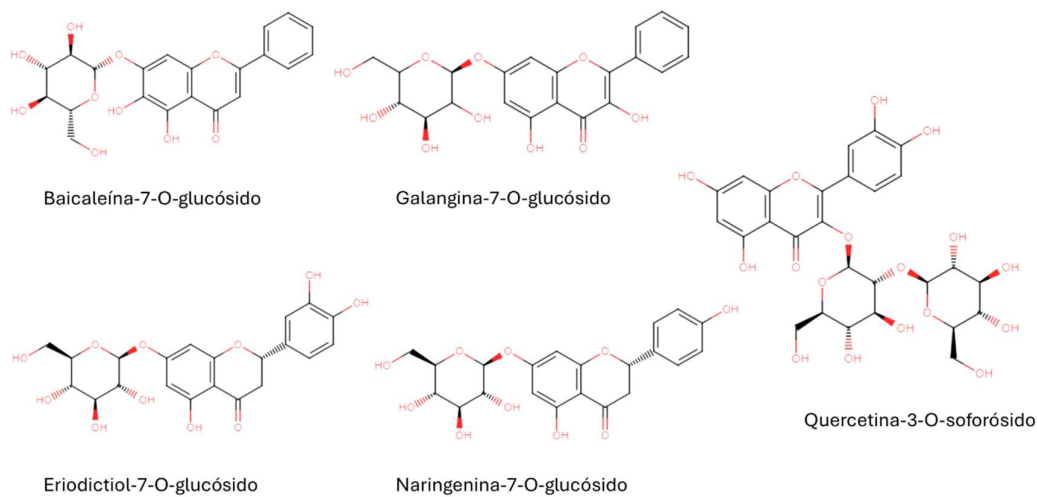


Figura 1.9. Representación de las estructuras reportadas en el extracto de *Cissampelos pareira* por la Dra. Ricciardi.

1.6. *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart.

El género *Nectandra* se encuentra dentro de la familia Lauraceae y comprende aproximadamente 120 especies localizadas en áreas tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Oceanía. El género se encuentra relacionado con los géneros *Ocotea*, *Endlicheria*, *Rhodostemonodaphne*, *Licaria*, *Umbellularia*, *Pleurothryrium*, entre otros (Macías-Villamizar et al., 2015). Particularmente *Nectandra angustifolia* es una planta nativa de Sudamérica, encontrándose en el centro y noreste de Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia y Brasil. Se distribuye en zonas húmedas, predominantemente a lo largo de los ríos, en especial por la cuenca del Río Paraná. Se desarrolla en forma de arbustos o árboles pequeños (de hasta 12 metros de altura), las ramas son delgadas y pueden tener algunos pelos cortos. Las hojas son largas y estrechas, se van afinando hacia la punta, y pueden medir entre 4.5 y 22 cm de longitud. Tienen un margen plano y venas bien definidas. Las flores aparecen en racimos, generalmente en las axilas de las hojas, y miden entre 4.5 y 7 mm de ancho, con pétalos ovalados que tienen pequeños bultos en el interior. Los estambres son cortos, y el fruto es una baya elipsoide que mide entre 13 y 20 mm de longitud.

Popularmente recibe el nombre de laurel amarillo, laurel de río o aju'y hû. En la literatura ha recibido otros nombres que son aceptados como sinónimos, tales como: *Nectandra angustifolia* var.

falcifolia Nees; *Nectandra falcifolia* (Nees) J.A.Castigl. ex Mart.Crov. & Piccinini; *Nectandra laurel-hu* D.Parodi; *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez; *Nectandra membranacea* f. *floribunda* Hassl.; *Nectandra membranacea* var. *falcifolia* (Nees) Hassl.; *Nectandra membranacea* var. *saligna* (Nees & Mart.) Hassl.; *Nectandra paraguayensis* D.Parodi; *Nectandra racemifera* Meisn.; *Nectandra saligna* Nees & Mart.; *Nectandra saligna* var. *obscura* Meisn.; *Nectandra tweediei* (Meisn.) Mez; *Ocotea angustifolia* Schrad.; *Oreodaphne tweediei* Meisn.; *Oreodaphne tweediei* var. *cymulosa* Meisn.; *Persea angustifolia* Bartl. ex Meisn.; *Persea ayui*-y D.Parodi; *Tetranthera megapotamica* Spreng.



Figura 1.10. A. Mapa de distribución de la especie *N. angustifolia*. Figura obtenida de World Flora Online⁵. **B.** Fotografía de un ejemplar de *N. angustifolia*.

Esta especie ha sido utilizada en la medicina tradicional como digestivo, purgante, antiespasmódico y para el tratamiento de reumatismo, artritis y dolor. Se encuentra descrito el uso de las hojas para el tratamiento local de los efectos causados por mordedura de víboras venenosas de la región (González Torres, 1992). Este reporte motivó el estudio previo realizado por la Dra. Torres en el que se demostró el efecto neutralizante del extracto etanólico de las hojas sobre las actividades hemolíticas y coagulantes del veneno de *Bothrops diporus* (Torres et al., 2011). En cuanto a la actividad antiinflamatoria, existen dos estudios que utilizan extractos de hojas de *Nectandra angustifolia*, lo que les otorga especial relevancia. No obstante, podrían existir diferencias en los metabolitos presentes debido a variaciones edafoclimáticas. Melo y colaboradores (2006) han administrado *in vivo* por vía oral extracto etanólico en ratones y reportado su efecto antiinflamatorio en modelos de edema de pata y pleuresía inducidas por carragenina, a su vez también han empleado un modelo de edema de oreja inducida por aceite de crotón y aplicación tópica del extracto demostrando también su efecto por este medio (Oliveira De Melo et al., 2006). Por su lado Truiti y colaboradores realizaron un cribado de diferentes plantas de Brasil dentro de las cuales se encontraba *Nectandra angustifolia*, la administración del extracto etanólico de manera

⁵ WFO (2024): *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000379182>.

oral en ratas produjo una disminución en la respuesta inflamatoria inducida por la inyección pleural de carragenina (Truiti et al., 2006).

La investigación del uso de extractos provenientes de estas plantas, como agentes antiinflamatorios para el tratamiento de los efectos locales agudos provocados por las mordeduras de serpientes del género *Bothrops*, resulta de gran relevancia en el campo de la medicina o toxicología. Aunque los antivenenos comerciales son efectivos para neutralizar los efectos sistémicos del veneno, presentan limitaciones al tratar los daños locales inmediatos, como el edema, el sangrado y la necrosis en los tejidos cercanos a la mordedura. Estos síntomas, si no se tratan adecuadamente, pueden generar complicaciones graves como infecciones, pérdida de función en las extremidades o incluso la amputación. En este contexto, y dado los reportes mencionados anteriormente, profundizar en la exploración del potencial de plantas como *N. angustifolia* y *C. pareira* representa una vía prometedora para el desarrollo de tratamientos complementarios. El uso de productos naturales en conjunción con antivenenos podría optimizar la atención médica al controlar tanto los efectos sistémicos como los locales del veneno, mejorando así la calidad de vida de las personas afectadas y reduciendo la incidencia de secuelas a largo plazo.

Objetivos

Generales

Profundizar el conocimiento sobre la extracción y caracterización de flavonoides activos de las especies vegetales autóctonas mencionadas y evaluar sus potenciales efectos biológicos (antiinflamatorio, antioxidante y antitumoral) por estudios multiparamétricos *in vivo* e *in vitro* para su potencial aplicación en fitoterapia.

Específicos

1. Obtener extractos etanólicos a partir de las partes aéreas de *Nectandra angustifolia* y *Cissampelos pareira*.
2. Evaluar sus propiedades fitoquímicas determinando contenido de fenoles y flavonoides.
3. Determinar el efecto citotóxico de los extractos sobre diferentes líneas celulares tumorales humanas.
4. Evaluar las propiedades antioxidantes de los extractos *in vitro*.
5. Evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos por técnicas *in vitro* en cultivos de células y modelos *in vivo*.
6. Aislar fracciones enriquecidas en flavonoides por técnicas cromatográficas; comprobar las propiedades biológicas antes mencionadas y profundizar su estudio a nivel molecular.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y
MÉTODOS

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1.	Preparación de extractos	33
2.1.1.	<i>Nectandra angustifolia</i>	33
2.1.2.	<i>Cissampelos pareira</i>	33
2.2.	Análisis fitoquímico	34
2.2.1.	Contenido de fenoles totales.....	34
2.2.2.	Contenido de flavonoides totales	34
2.3.	Actividad antioxidante por DPPH.....	35
2.4.	Caracterización por cromatografía	35
2.4.1.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	35
2.4.2.	Cromatografía en placa delgada (TLC)	35
2.4.3.	Espectrometría de masas por infusión directa.....	36
2.5.	Separación de compuestos por cromatografía.....	36
2.5.1.	Cromatografía flash	36
2.5.2.	Cromatografía HPLC preparativa	37
2.5.3.	Determinación de espectros por lectora de microplacas	37
2.6.	Cultivo celular	37
2.6.1.	Línea celular A549	38
2.6.2.	Línea celular Caki-2	38
2.6.3.	Línea celular HT-29.....	38
2.6.4.	Línea celular THP-1.....	38
2.6.5.	Línea celular L929	38
2.6.6.	Línea celular HEK-293.....	38
2.6.7.	Línea celular RAW 264.7	39
2.6.8.	Línea celular BV-2.....	39

2.7.	Ensayos de viabilidad celular	39
2.7.1.	Coloración con azul de tripano	39
2.7.2.	Reducción de sales de tetrazolio	39
2.6.2.1.	XTT	39
2.6.2.2.	MTS	40
2.8.	Ensayos con citometría de flujo	40
2.8.1.	Ciclo celular	40
2.8.2.	DPBA	40
2.9.	Fluorescencia	40
2.9.1.	NF- κ B	41
2.9.2.	DPBA	41
2.10.	Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por DCFH2-DA	41
2.11.	Ensayos en sobrenadantes celulares	42
2.11.1.	Cuantificación de citoquinas por ELISA	42
2.11.2.	Producción de óxido nítrico por Griess	42
2.12.	Western blot	42
2.13.	Análisis de la expresión de ARNm	43
2.13.1.	Obtención de ARN	43
2.13.2.	Retrotranscripción	43
2.13.3.	qPCR	43
2.14.	Animales	43
2.14.1.	Test de formalina	44
2.14.2.	Neuroinflamación	45
2.15.	Análisis estadístico	45

2.1. Preparación de extractos

2.1.1. *Nectandra angustifolia*

La recolección de partes aéreas de la especie se realizó de acuerdo con la experiencia previa de la Dra. Torres (Torres et al., 2011), en la localidad de San Isidro, Corrientes, Argentina, coordenadas 27°50' 51.9" S 58°42' 46.3" O. Un espécimen de referencia se guardó en el herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) con el número CTES Tressens 7094.



Figura 2.1. Ejemplar de *N. angustifolia* recolectado. Se observan las características hojas largas y estrechas que se afinan hacia el extremo.

2.1.2. *Cissampelos pareira*

La recolección de partes aéreas de la especie se realizó de acuerdo con la experiencia previa de la Dra. Ricciardi (Ricciardi Verrastro et al., 2018), en la localidad de Paso de la Patria, Corrientes, Argentina, coordenadas 27°22'58.6" S, 58°34'56.4" O. Un espécimen de referencia se guardó en el herbario del IBONE bajo el número CTES Torres 17.



Figura 2.2. Ejemplar de *C. pareira* recolectado. Se observan las características hojas en forma ovalada a corazonada.

Para la preparación de los extractos etanólicos de *N. angustifolia* (NaE) y de *C. pareira* (CpE) se utilizó el mismo protocolo. Las hojas se dejaron secar por oreo, luego fueron molidas, tamizadas (tamiz 20) y maceradas con etanol 95° por 48 h. Posteriormente se filtraron con un embudo de

Buchner con ayuda de una bomba de vacío y fueron secadas a presión reducida utilizando un rotavapor Büchi R-124 (Figura 2.3). Los extractos se mantuvieron en desecadores a presión reducida hasta su uso.



Figura 2.3. Rotavapor Büchi R-124 conectado a refrigerador Arcano® MP-10c conectado a una bomba de vacío.

2.2. Análisis fitoquímico

2.2.1. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales en el extracto fue evaluado por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Se mezcló por agitación la muestra con el reactivo de Folin (dilución 1:4) por 1 min y luego 3 min en reposo. Se adicionó Na_2CO_3 al 10% y se incubó 30 min a 40°C . La absorbancia de la muestra se midió a 750 nm. Se utilizó una curva estándar con ácido gálico como patrón. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

2.2.2. Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó por un ensayo colorimétrico empleando NaNO_2 y AlCl_3 (Baba & Malik, 2015). Se agregaron los extractos 1 mg/mL y diluciones seriadas de ser necesario, se añadió NaNO_2 al 5% y se dejó reposar 5 min, luego se adiciona AlCl_3 2% y se dejó reposar por 1 min para finalmente adicionar NaOH 4%. La absorbancia de la muestra se midió a 470 nm y los resultados se expresaron utilizando una curva estándar con quercetina, quedando así expresados como mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto.

2.3. Actividad antioxidante por DPPH

La actividad antioxidante se determinó utilizando el método de captado del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Molyneux, 2004). La mezcla de reacción consistió en una solución preparada en el día de DPPH con absorbancia cercana a 0,8 a 517 nm, mezclada con un volumen fijo de extractos. La actividad captadora de radicales se calculó como $\%AOA = 100 - [100 \cdot (A_0 - A_s) / A_0]$ donde A_0 es la absorbancia a 517 nm de la solución de DPPH al tiempo inicial y A_s es la absorbancia de la muestra con DPPH luego de 30 minutos. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de trolox por gramo de extracto de acuerdo con lo obtenido por una curva estándar con trolox.

2.4. Caracterización por cromatografía

2.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con fines analíticos se utilizó el equipo HPLC Shimadzu LC-10/20 A (Tokio, Japón) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) UV-visible Shimadzu SPD-20 MA (Tokio, Japón). La columna utilizada fue una Hypersil ODS 250 x 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 5 μ m (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos) cuya química corresponde a una columna de C18. El detector quedó seteado a 280 nm para la corrida cromatográfica y luego se analizaron los picos observados en el rango UV-Visible. Los tiempos de retención y los perfiles de absorción fueron comparados con los obtenidos para patrones de flavonoides, quercetina, rutina, quercitrina y quercetina-3- β -D-glucósido. Para las corridas se utilizó como fase móvil 0,05 M H_3PO_4 pH=3,0 (Fase A) y metanol (Fase B). El flujo se estableció en 0,7 mL/min y el gradiente de elución 0 - 5 min 30% de B; 5,01 - 15 min 50% de B; 15,01 - 25 min 70% de B seguido por un lavado y reacondicionamiento de la columna por 10 minutos.

2.4.2. Cromatografía en placa delgada (TLC)

Las cromatografías en placa delgada fueron realizadas con placas de sílica gel 60 F254 (Supelco®) con diferentes sistemas de elución. La cámara cromatográfica se dejó saturar con los vapores de la fase móvil previamente. La mezcla de solventes utilizada para separación de NaE fue: acetato de etilo y metanol (8:2) de acuerdo con trabajos de la Dra. Torres (Torres et al., 2023). El sistema de solventes para la separación de CpE fue: tolueno y acetato de etilo (9:1) de acuerdo con trabajos de la Dra. Ricciardi (Ricciardi Verrastro et al., 2018). En cuanto al sistema de solventes para la separación de flavonoides glicosilados, el mismo fue: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua (100:11:11:27) de acuerdo con la bibliografía (Debenedetti et al., 2016; Heinrich et al., 2018).

Una vez finalizada la cromatografía se realizó la observación a 254 nm, 365 nm y revelado con reactivo universal *p*-anisaldehído sulfúrico o con reactivo ácido difenil borónico 2 amino etil

éster (DPBA) para la detección de flavonoides (Debenedetti et al., 2016). El revelado con DPBA implicó asperjar una solución al 1% en metanol, dejar secar y luego asperjar una solución de polietilenglicol (PEG) al 5% en etanol, la incorporación de PEG mejora la sensibilidad de la detección. El *p*-anisaldehído sulfúrico se asperjó sobre la placa y luego esta se sometió a calor para el revelado. Los flavonoides aparecen opacos en 254 nm, en tonos rojizos con el *p*-anisaldehído sulfúrico y, de acuerdo con su estructura, en coloraciones amarillo-verdosas o en tonos naranjas con DPBA a 365 nm (Debenedetti et al., 2016).

2.4.3. Espectrometría de masas por infusión directa

Se prepararon las muestras en metanol grado HPLC y se filtraron a través de un filtro de 0,4 µm, posteriormente se diluyó la muestra hasta una concentración de 1 ppm. La muestra se inyectó en el equipo Sciex 4500 triple cuadrupolo. Los parámetros utilizados en el espectrómetro fueron - 4500 V para el spray de iones (modo negativo) y se utilizaron diferentes energías de colisión para estudiar la fragmentación de la molécula en el tercer cuadrupolo.

2.5. Separación de compuestos por cromatografía

2.5.1. Cromatografía flash

Se utilizó una columna rellena de sílica gel flash (sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) Milipore®), cargada con el 1% del peso, es decir para una columna de 50 g se colocaron 500 mg de extracto. Se utilizó una bomba de pecera para lograr la presión necesaria para la elución. Para preparar la columna se colocó un algodón por debajo, luego una fina capa de arena y por último se agregó la sílica gel disuelta con el primer solvente a utilizar, logrando una consistencia similar al barro. El cargado de este preparado en la columna siguió un patrón circular a fin de lograr una columna homogénea. Una vez rellena la columna, se agregó la muestra seca, para lo cual se preparó previamente disolviendo la muestra en un volumen pequeño y agregando sílica, luego se evaporó el solvente y se agrega esa sílica impregnada con muestra para mejorar la superficie de contacto. Se puede observar el equipo armado en la **Figura 2.4**.

Para *N. angustifolia* se utilizó un gradiente eluotrópico de acetato de etilo a metanol (aumento de polaridad), comenzando con 100 ml de acetato de etilo y cambiando a una proporción 90:10, luego con incrementos del 10% hasta llegar al 100% de metanol.

Para *C. pareira* se usó una serie eluotrópica empezando por tolueno, luego acetato de etilo y finalizando en metanol (aumento de polaridad), de acuerdo con lo probado por la Dra. Ricciardi (Ricciardi Verrastro et al., 2018).



Figura 2.4. Sistema de fraccionamiento en flash con sílica gel.

2.5.2. Cromatografía HPLC preparativa

Para la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con fines preparativos se utilizó el equipo HPLC Shimadzu LC-20 AR (Tokio, Japón) acoplado a un detector de UV-visible Shimadzu SPD-40 (Tokio, Japón). La columna utilizada fue una Shim-pack GIS C18 250 x 14 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm (Shimadzu®, Tokio, Japón). El detector quedó configurado a 280 nm para la corrida cromatográfica. Para las corridas se utilizó como fase móvil 0,1% ácido fórmico (Fase A) y metanol (Fase B). El flujo se estableció en 10 mL/min y el mismo gradiente de elución que el utilizado para el HPLC analítico.

2.5.3. Determinación de espectros por lectora de microplacas

Para la determinación del espectro de absorción se procedió a tomar 100 μL de las mezclas correspondientes a cada pico obtenido en el HPLC preparativo y colocarlo en una microplaca UV. Se registraron las absorbancias en el rango 200 a 450 nm y se obtuvieron los máximos de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) en una lectora de microplacas UV-Visible Multiskan Skyhigh (Thermofisher).

2.6. Cultivo celular

Los medios de cultivo utilizados para cada línea celular se detallan a continuación, estos medios se adicionan con 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina/ estreptomycin al 1% para la obtención de lo que se denomina “medio completo”. Las células se cultivaron en estufa a 37°C en humedad y con 5% de CO_2 . En todos los experimentos realizados con líneas celulares, las mismas se dejaron aclimatar por 24 h luego de ser sembradas en los pocillos o placas correspondientes.

Las preparaciones de los medios de cultivo se realizaron a partir de su forma sólida de acuerdo con las especificaciones del fabricante y ajustando un pH final de 7,4.

Los tratamientos realizados con lipopolisacárido bacteriano fueron utilizando LPS (*Escherichia coli* O127:B8, γ -irradiated, Sigma, Darmstadt, Germany) en concentración de 1 μg /mL para células RAW 264.7 y de 0,1 μg /mL para BV-2.

2.6.1. Línea celular A549

La línea de células tumorales de carcinoma de pulmón humanas A549 originadas de la colección de células americanas (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con el suplemento F12 (DMEM-F12). Para el levantamiento de las células se utilizó una solución de tripsina y EDTA.

2.6.2. Línea celular Caki-2

La línea de células tumorales humanas de carcinoma de renal Caki-2 originadas de la colección de células americana (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con el suplemento F12 (DMEM-F12). Para el levantamiento de las células se utilizó una solución de tripsina y EDTA.

2.6.3. Línea celular HT-29

La línea de células tumorales de carcinoma de colon humanas HT-29 originadas de la colección de células americana (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM). Para el levantamiento de las células se utilizó una solución de tripsina y EDTA.

2.6.4. Línea celular THP-1

La línea de células tumorales de leucemia monocítica crónica humana THP-1 originadas de la colección de células americana (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640). Al ser células en suspensión su trasplante se realizó por centrifugación y agregado en medio nuevo.

2.6.5. Línea celular L929

La línea de células de fibroblastos murinos L929 originadas de la colección de células americana (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM). Para el levantamiento de las células se utilizó una solución de tripsina y EDTA.

2.6.6. Línea celular HEK-293

La línea de células embrionarias de tejido renal humanas HEK-293 originadas de la colección de células americana (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM). Para el levantamiento de las células se utilizó una solución de tripsina y EDTA.

2.6.7. Línea celular RAW 264.7

La línea de células macrofágicas murinas RAW 264.7 originadas de la colección de células americana (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM). Para el levantamiento de las células se utilizó una solución de EDTA y despegue mecánico.

2.6.8. Línea celular BV-2

La línea de células de microglía murinas BV-2 originadas de la colección de células americana (ATCC por sus siglas en inglés) fue utilizada. Las células se incubaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM). Para el levantamiento de las células se utilizó una solución de EDTA y dislocación mecánica.

2.7. Ensayos de viabilidad celular

2.7.1. Coloración con azul de tripano

Las tinciones vitales se utilizan con la finalidad de determinar la viabilidad celular, en el caso del azul de tripano las células con la membrana intacta son impermeables al colorante por lo que se considera a las teñidas como células muertas. Se utilizó azul de tripano de manera regular para comprobar la viabilidad de las células descongeladas, así mismo se empleó en experimentos de viabilidad celular utilizando placas de 24 pocillos que fueron levantadas de acuerdo con las especificaciones de la línea. Para la tinción se utiliza una solución preparada al 0,4% y filtrada, se mezcla con la suspensión de células en proporción 1:1 y luego se realiza el recuento en cámara de Neubauer (Gilbert, 2017). Los resultados se expresan como concentración de células por mL o como cantidad absoluta de células al multiplicar por el volumen de la suspensión.

2.7.2. Reducción de sales de tetrazolio

La viabilidad celular se puede medir de acuerdo con los niveles de NADH y NADPH formados por actividad metabólica. Estos son utilizados por deshidrogenasas celulares para reducir sustratos como sales de tetrazolio las cuales producen compuestos de formazán coloreados (Gilbert, 2017).

2.6.2.1. XTT

El ensayo de viabilidad celular por reducción de sal de tetrazolio XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, Mn, USA). Brevemente, se sembraron las células en placas de 96 pocillos, el número de células dependió de la línea utilizada, y se dejaron aclimatar por 24h. Posteriormente se trataron las células con los compuestos de interés por triplicado durante el tiempo establecido para el ensayo. Una vez concluido el tiempo se removió el medio y se adicionó el reactivo XTT preparado en medio sin rojo fenol. Se incubaron las placas por 4 h en estufa a 37°C 5% CO₂ y humedad para luego realizar las mediciones de absorbancia en una lectora de

microplacas MR-96A (Mindray®) a 490 nm (longitud de onda de lectura) y a 630 nm (longitud de onda de referencia). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de células sin tratar (control).

2.6.2.2. MTS

Para el ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)) se utilizó el kit Cell Titer 96® (Promega Corporation, Madison, WI, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. A diferencia del kit de XTT, en este caso se agrega el reactivo sobre las células una vez finalizada la incubación estipulada y luego se incuba 4 h en la estufa en condiciones de cultivo por lo que el tratamiento previo ya se realizó en medio sin rojo fenol. Las absorbancias se registran a 490 nm en lector de microplacas Cytation 5 (Agilent) y se expresan los resultados como porcentaje respecto a las células sin tratar (control).

2.8. Ensayos con citometría de flujo

2.8.1. Ciclo celular

Las células fueron incubadas con los tratamientos de acuerdo con el experimento a realizar. Posteriormente fueron levantadas y luego fijadas y permeabilizadas con etanol 70% en frío. La concentración de células se ajustó a 1×10^6 células/mL. Se realizó un tratamiento con ARNsa A (Sigma, Darmstadt, Germany) por 15 minutos a 37°C y se tiñeron con ioduro de propidio 1 mg/mL (Sigma, Darmstadt, Germany) por 15 minutos. El análisis del contenido de ADN de las células fue realizado en un FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, USA) y los datos obtenidos procesados con el software FlowJo (BD Biosciences, San José, CA, USA). El detector del FACSCalibur se estableció en escala aritmética y no logarítmica para poder obtener los datos y se realizó una eliminación de dobletes a fin de evitar resultados erróneos.

2.8.2. DPBA

La detección de flavonoides por medio de la tinción con DPBA en líneas celulares ha sido explorada en la literatura y se ha realizado de acuerdo con lo publicado (Ferrara & Thompson, 2019; J. H. Lee et al., 2014). Brevemente, luego de la realización de los tratamientos correspondientes se fijaron las células en suspensión con formol tamponado al 4% y permeabilizaron con tritón X-100, posteriormente se adicionó una solución al 0,25% de DPBA para la tinción por 30 min, se lavaron las células con PBS y luego se adquirieron en el citómetro. La intensidad de fluorescencia se determinó en el canal V11 correspondiente a λ_{ex} 405 nm y λ_{em} 664 del Cytex Aurora® por ser el canal con mayor señal de fluorescencia de los disponibles en este citómetro espectral.

2.9. Fluorescencia

Para realizar marcaciones con anticuerpos y su posterior observación microscópica, las células se cultivaron sobre cubreobjetos estériles dentro de las placas correspondientes. Para favorecer la adhesión, al momento de sembrar las células se dejó en estufa con un volumen

pequeño de medio durante unas horas para luego completar el volumen de medio acorde y dejarlas hasta el día siguiente. En el día del ensayo, se confirmó que se alcanzó la densidad celular deseada y se procedió al esquema experimental. Para finalizar el tiempo de tratamiento, se removió el medio y se adicionó formol tamponado en frío al 4%, de esta manera las células quedan fijadas y luego se permeabilizaron con tritón X-100 al 0,1%.

2.9.1. *NF-κB*

La inducción de la traslocación de NF-κB se estudió por estímulo con LPS. Las células se pretrataron con los compuestos de interés y luego se expusieron a LPS por 1 h, para la determinación de la ubicación celular de la proteína p65 (citoplasma o núcleo). Una vez fijada y permeabilizada las células, se bloqueó con suero de cabra al 10% y se incubó con el anticuerpo primario a 4°C durante la noche. Se utilizó anti NF-κB p65 SC-8008 (Santa Cruz Biotechnology®) dilución 1:50. Al día siguiente se colocó el anticuerpo secundario marcado (TRITC) y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Se montaron los preparados y se observaron en microscopio confocal LeicaTCS SP5X. Las imágenes se adquirieron en el canal rojo y el canal azul para DAPI.

2.9.2. *DPBA*

La tinción con DPBA para microscopia confocal ha sido descrita en los últimos años para células, previamente se había limitado el uso para cortes de plantas con el fin de observar localización de flavonoides (Ferrara & Thompson, 2019). Brevemente las células fueron tratadas con los extractos por el tiempo indicado. Una vez fijadas y permeabilizadas se procedió a la tinción con DPBA 0,25%. Posteriormente se lavaron, se tiñeron los núcleos con DAPI y se montaron los preparados para su observación en microscopio confocal LeicaTCS SP5X. Las imágenes se adquirieron en el canal verde y el canal azul para DAPI.

2.10. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por DCFH₂-DA

La sonda fluorescente DCFH₂-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) es permeable a la membrana celular y al ingresar es cortada por esterasas intracelulares que dificultan su egreso. Posteriormente, el ahora DCFH₂, reacciona con ROS intracelulares para dar DCF fluorescente (X. Chen et al., 2010).

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos negras para fluorescencia. Se ajustó previamente la densidad al tipo de células y luego de sembrarse se dejaron aclimatar por 24 h. Las células fueron tratadas de acuerdo con el esquema experimental de manera previa o posterior al agregado de la sonda. Para la adición de la sonda DCFH₂-DA 10 μM, se preparó la misma y se adicionó en oscuridad, se incubó 30 min en estufa de cultivo y luego se lavaron las células con PBS. Una vez cumplido el tiempo requerido se leyó la fluorescencia en un lector de microplacas Cytation 5 (Agilent) con λ_{ex} 480 nm y λ_{em} 525 nm. Los resultados se expresaron en unidades relativas de fluorescencia.

2.11. Ensayos en sobrenadantes celulares

2.11.1. Cuantificación de citoquinas por ELISA

Los niveles de proteínas secretadas de IL-1 β , IL-6 y TNF α se evaluaron en el medio de cultivo de las células con los tratamientos acordes. Se utilizaron kits comerciales de ELISA (InvitrogenWaltham, MA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de cultivo son congelados hasta el día del ensayo. Cada kit incluye una curva estándar con proteína recombinante y se expresaron los resultados en base a la curva obtenida en pg/mL o ng/mL según corresponda.

2.11.2. Producción de óxido nítrico por Griess

Los niveles de nitritos en el sobrenadante de cultivo celular se midieron con el reactivo de Griess. El reactivo se preparó combinando partes iguales de A y B, siendo la solución A 1 % sulfanilamida en 5% H₃PO₄ y la solución B 0,1% N-naftiletildiamina clorhidrato en H₂O destilada. El sobrenadante de cultivo se mezcló entonces con el reactivo de Griess en partes iguales y se incubó en oscuridad por 30 min. Luego se realizó una lectura de absorbancia a 540 nm en lectora de microplacas Multiskan Skyhigh (Thermofisher®) o lector de microplacas Cytation 5 (Agilent®). Los resultados se expresaron en base a una curva de calibrado de NaNO₂ en μ M de NO₂⁻.

2.12. Western blot

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos, una vez finalizado el tiempo de tratamiento indicado para las células, se lavaron con PBS por duplicado y se homogeinizaron en buffer de lisis (20 mM Tris-HCl conteniendo 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1mM Na₃VO₄, 150 mM NaF, 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro y cóctel inhibidor de proteasas) a 4°C y diluidas 2:1 en tampón Laemmli. La cantidad de proteína se ensayó utilizando el reactivo de Bradford con una curva de calibrado con albúmina. Cantidades iguales de proteína se separaron utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Una vez finalizada la corrida electroforética, se realizó la transferencia de las proteínas a un soporte en membrana de fluoruro de polivinildeno (PVDF). Se comprobaron las transferencias por tinción con rojo Ponceau S. Las membranas se bloquearon durante 2 h utilizando una solución de leche descremada al 5% o albúmina al 3% (para proteínas fosforiladas) en TTBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl y 0,1% Tween 20) a temperatura ambiente. Luego se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C. Para el revelado se utilizó un anticuerpo secundario acorde conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a temperatura ambiente por 1 h. Las señales producidas fueron detectadas por un sistema de quimioluminiscencia (ECL) incubando las membranas con el reactivo y revelando la señal por exposición sobre una placa radiográfica.

Los anticuerpos utilizados fueron: COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); HIF-1 α , iNOS (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA); p-NF κ B-p65 (Ser536), p-I κ B α (Ser32), p-c-JUN (S63), CHOP (Cellsignaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA); HO-1 (StressMarq Biosciences Inc.,

Victoria, British Columbia, Canada); β -actin (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) ARG-1, GRP78, GRP94 (SantaCruz Biotechnology, USA).

2.13. Análisis de la expresión de ARNm

2.13.1. Obtención de ARN

Las células se trataron de acuerdo con esquema indicado y posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS. Tras el lavado, se agregó 1 mL de TRI reagent® (Sigma Aldrich) homogeneizando en frío. Posteriormente se siguieron las indicaciones del fabricante con los agregados de cloroformo para separar las fases, isopropanol para precipitar el ARN y el lavado con etanol. Una vez obtenido el ARN y suspendido en H₂O tratada con dietil pirocarbonato, se cuantificó a 260 nm la absorción y la relación 260/280 para ver impurezas.

2.13.2. Retrotranscripción

Se retrotranscribió a ADN copia 1 μ g de ARN tomando como concentración la calculada por la absorbancia. En muestras de cultivos celulares se procedió directamente a la retrotranscripción con la enzima M-MLV (Sigma Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cambio en muestras provenientes de tejido animal, se realizó una limpieza del ADN genómico con turbo DNase® (Thermofisher) siguiendo las indicaciones del fabricante y posteriormente se retrotranscribió 1 μ g de ARN.

2.13.3. qPCR

Los ADN copia obtenidos fueron sometidos a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando la enzima HOT FIREPol® EvaGreen® (Solis Byodine, Tartu, Estonia). El perfil de temperaturas utilizado fue el recomendado por el fabricante. La expresión relativa de cada gen se normalizó respecto con el gen de GAPDH y se calculó utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ (Overbergh et al., 2003). Se detallan a continuación en la **tabla 2.1** los cebadores utilizados.

Tabla 2.1. Cebadores de ratón utilizados escritos en 5'-3'

Proteína codificada	Forward	Reverse
IL-1 β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
TNF α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
iNOS	GTTCTCAGCCCAACAATAACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

2.14. Animales

Los animales fueron provistos por el bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, y se mantuvieron bajo condiciones estándares de laboratorio (temperatura ambiente 25°C $\pm$ 2°C, humedad relativa 55-60% y ciclos de luz oscuridad de 12 h) con acceso libre

a comida y agua. Los tratamientos animales se realizaron de acuerdo con las guías de ética internacional acerca del cuidado y uso de animales de laboratorio.

2.14.1. Test de formalina

Ratones macho CF-1 (25-30g) fueron utilizados con aprobación por el comité de cuidado animal de la Facultad de Medicina, UNNE (#0012-IACUC/19). El ensayo de comportamiento inducido por formalina fue realizado de acuerdo a la literatura (H. Chen et al., 2016; M. J. Lee et al., 2012; Mannan et al., 2017). Cada ratón fue asignado al azar a uno de los cuatro grupos experimentales, colocado en una jaula de plexiglás transparente sin cama y permitiendo su movimiento libre por 20 minutos. De acuerdo con el grupo experimental asignado los ratones recibieron vehículo i.p. (control), NaE (50 mg/kg i.p.), NaE (5 mg/kg i.p.) o tramadol (4 mg/kg i.p.). Luego de 15 minutos se inyectaron 40 μ L de formalina al 2,5% (v: v) de manera subcutánea en la planta dorsal izquierda. Inmediatamente posterior a la inyección se comienza la grabación del comportamiento animal (lamido de pata). Los animales son grabados durante 35 minutos, y se analizan los tiempos 0-5 minutos (fase neurogénica del dolor) y 15-30 minutos (fase inflamatoria del dolor). La dosis utilizada de NaE fue determinada con reportes previos *in vivo* (Oliveira De Melo et al., 2006), la elección y dosis de la droga control tramadol fueron realizadas de acuerdo a publicaciones previas (Flecknell, 2009; Oliva et al., 2002).

El edema de pata inducido por formalina fue adaptado de estudios previos (Fu et al., 2000; M. J. Lee et al., 2012). Brevemente, luego de 1 h de la inyección de formalina el edema de pata se midió por medio de un calibre en el eje dorsal-plantar. El grosor medido en la pata derecha se utilizó como control para cada ratón y los resultados fueron expresados como porcentaje de incremento respecto de dicha pata. Las medidas fueron repetidas 4 veces y realizadas por un investigador con desconocimiento de las condiciones experimentales.

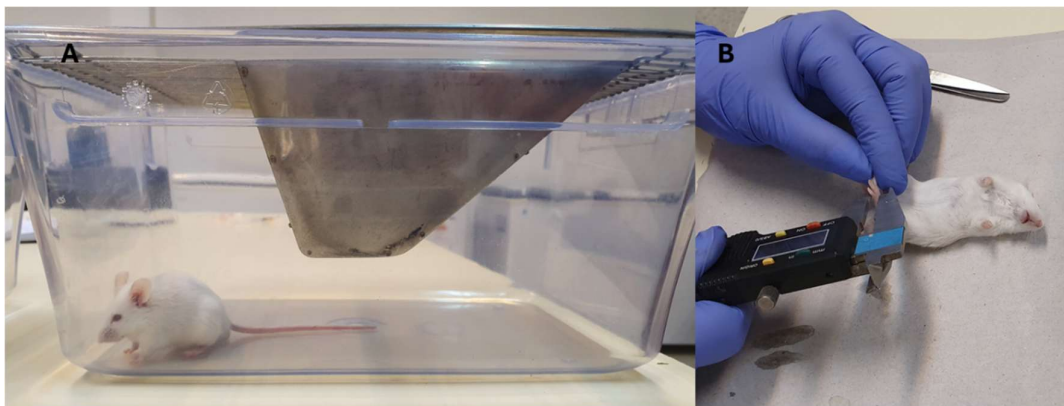


Figura 2.5. Fotos representativas de los procedimientos realizados en el test de formalina. **A.** Contenedores de plexiglás transparente utilizados durante los experimentos. **B.** Medición con el calibre del edema.

2.14.2. Neuroinflamación

Ratones macho BALB/c (25-30g) fueron utilizados con aprobación por el comité de cuidado animal de la Facultad de Medicina, UNNE (Protocolo #007-2021 CICUAL). Los ratones fueron divididos en 5 grupos (n=6 por grupo): control (inyección del vehículo), LPS (3 mg/kg i.p.), NaE (5 mg/kg i.p.) + LPS (3 mg/kg i.p.), NaE (50 mg/kg i.p.) + LPS (3 mg/kg i.p.) y dexametasona (2 mg/kg i.p.) + LPS (3 mg/kg i.p.). El uso de un grupo con dexametasona corresponde a una droga antiinflamatoria control descripta (Castaño et al., 2002). Los grupos de LPS y LPS con dexametasona también recibieron la inyección del mismo vehículo (1% DMSO, 10% etanol, 10% PEG 400 y solución salina). La administración de NaE, dexametasona o vehículo fueron 30 minutos previos al estímulo con LPS. Luego de 3 h los ratones fueron sacrificados y los cerebros colectados y conservados para su análisis.

2.15. Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias $\pm$ el desvío estándar. La significancia en la diferencia entre varios grupos se analizó utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de múltiples comparaciones de Dunnet. Para analizar la significancia en la diferencia entre únicamente dos grupos se utilizó la prueba de *t* de Student con la corrección de Welch. Los análisis estadísticos, y las gráficas presentadas en todas las figuras, fueron realizados en el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, USA).

CAPÍTULO III

*Obtención y caracterización química de
extractos vegetales*

RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

Capítulo III

Obtención y caracterización química de extractos vegetales

RESULTADOS	48
3.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS. RENDIMIENTO	48
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS	48
3.2.1. <i>Fitoquímica</i>	48
3.2.2. <i>Actividad antioxidante in vitro</i>	48
3.2.3. <i>Caracterización por HPLC</i>	48
3.3. FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS	50
3.3.1. <i>Fraccionamiento de NaE por cromatografía flash y análisis por TLC</i>	50
3.3.2. <i>Actividad antioxidante de las fracciones de N. angustifolia</i>	52
3.3.3. <i>HPLC-DAD fracciones N. angustifolia</i>	53
3.3.4. <i>Obtención en bache de fracciones de NaE</i>	54
3.3.5. <i>Fraccionamiento de CpE por cromatografía flash y análisis por TLC</i>	56
3.3.6. <i>Caracterización de fracciones de C. pareira</i>	58
3.3.7. <i>HPLC-DAD de las fracciones de C. pareira</i>	58
3.3.8. <i>HPLC preparativo N. angustifolia</i>	60
DISCUSIÓN.....	63
<i>Nectandra angustifolia</i>	63
<i>Cissampelos pareira</i>	65

RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados de caracterización de los extractos y sus fracciones, en los capítulos siguientes se los tratará de forma secuencial abordando en primer lugar los extractos enteros para luego dar paso a sus fracciones.

3.1. Obtención de la muestra vegetal y preparación de extractos. Rendimiento

Los extractos de *N. angustifolia* (NaE) y *C. pareira* (CpE) se obtuvieron a partir de partes aéreas tal como se menciona en materiales y métodos (**Sección 2.1**). Los extractos secos se mantuvieron en desecadores hasta su uso. Para NaE se obtuvo un rendimiento de 9,2% de extracto seco etanólico. En el caso de CpE se obtuvo un rendimiento del 11,2% de extracto seco etanólico.

3.2. Caracterización de los extractos

3.2.1. Fitoquímica

El contenido de compuestos fenólicos totales fue cuantificado, obteniendo $284,81 \pm 11,47$ mg equivalentes de ácido gálico por g de NaE. Los flavonoides se cuantificaron como $774,00 \pm 0,02$ mg equivalentes de quercetina por g de NaE.

El contenido de compuestos fenólicos totales obtenido fue de $195,85 \pm 10,13$ mg equivalentes de ácido gálico por g CpE y el de flavonoides de $640,38 \pm 57,49$ mg equivalentes de quercetina por g CpE.

3.2.2. Actividad antioxidante in vitro

La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante el método DPPH, dando como resultado $280,65 \pm 32,06$ mg equivalentes de trolox por g de NaE y $86,17 \pm 8,18$ mg equivalentes de trolox por g CpE.

3.2.3. Caracterización por HPLC

Los cromatogramas y espectros (200 – 450 nm) de NaE y de estándares de flavonoides se muestran en la **Figura 3.1 A y B**, respectivamente. El análisis HPLC-DAD del extracto etanólico reveló la presencia de cinco picos mayoritarios con un tiempo de retención (tr) entre 22 y 27,5 minutos. Cada uno de estos se analizó con el detector de arreglo de diodos y se obtuvieron los espectros UV que se muestran como insertos de la **Figura 3.1: pico I** (tr = 22,1 min, $\lambda_{\max}$ 255–355 nm), **pico II** (tr = 23,7 min, $\lambda_{\max}$ 253–355 nm), **pico III** (tr = 24,7 min, $\lambda_{\max}$ 255–349 nm), **pico IV** (tr = 25,1 min, $\lambda_{\max}$ 265–347 nm), **pico V** (tr = 26,9 min, $\lambda_{\max}$ 264–342 nm). Estos compuestos mostraron un espectro UV compatible con compuestos de la familia de flavonoides, además los tr son similares a los encontrados en otros flavonoides utilizados como la **rutina** (tr = 22,5 min, $\lambda_{\max}$ 255–355 nm), **quercetina-3-O-glucósido** (tr = 22,6 min, $\lambda_{\max}$ 256–355 nm), **quercitrina** (tr = 25,1 min, $\lambda_{\max}$ 255–350 nm), **quercetina** (tr = 27,9 min, $\lambda_{\max}$ 254–370 nm). Los picos I, II y III mostraron tiempos de retención

similares a los observados para la rutina y quercetina-3- β -D-glucósido y dado que sus espectros UV fueron similares, los compuestos de estos picos podrían considerarse derivados de la rutina o la quercetina. El pico IV tuvo un tiempo de retención muy similar al de la quercitrina; sin embargo, el espectro UV fue diferente; por lo tanto, no podemos inferir que el pico IV represente un derivado de la quercitrina. Además, no se detectó quercetina libre, y este hecho podría indicar que este compuesto está presente principalmente en forma de glucósido.

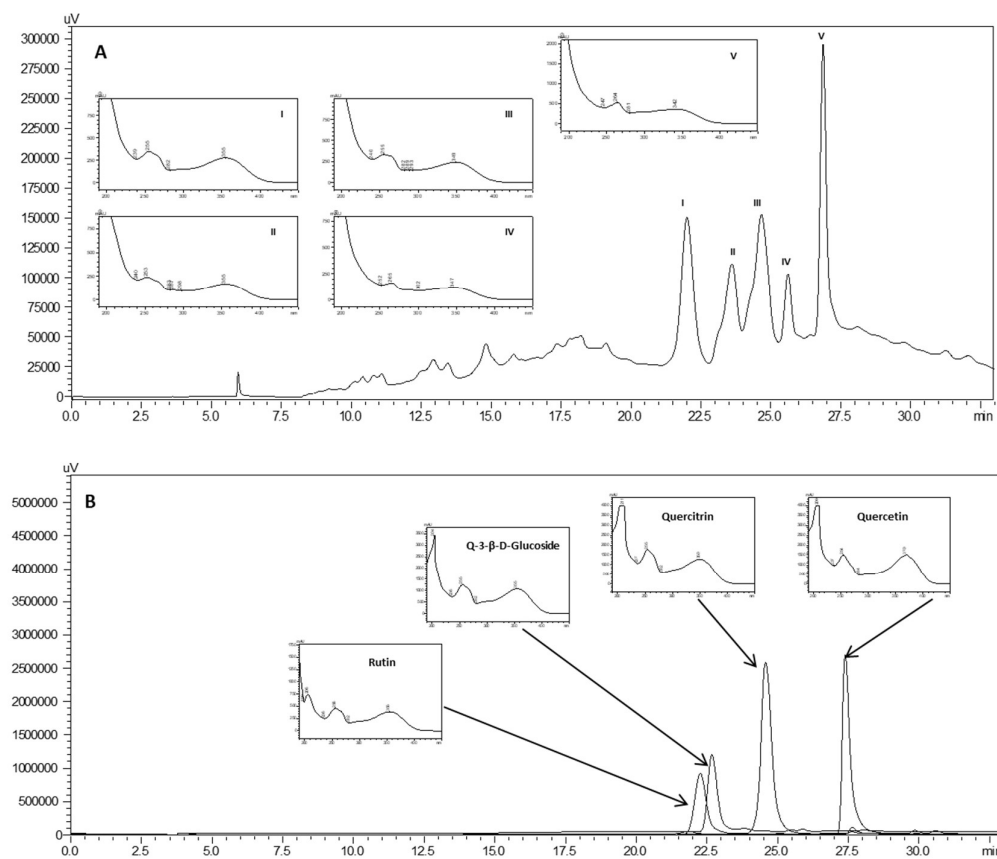


Figura 3.1. A. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de NaE a 280 nm y espectro UV obtenido con un detector de arreglo de diodos (DAD). El análisis cromatográfico del extracto entero revela la presencia de cinco picos intensos con un espectro UV compatible con flavonoides. **B.** Cromatograma y espectro UV de una mezcla de patrones (quercetina, rutina, quercitrina y quercetina-3- β -D-glucósido) corrida en las mismas condiciones que NaE. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Los cromatogramas y espectros (200 – 450 nm) de CpE se muestran en la **Figura 3.2**. El análisis HPLC-DAD del extracto etanólico reveló la presencia de cuatro picos mayoritarios que eluyeron entre los 15 y 20 minutos, por lo que estos compuestos presentan una clara diferencia con los encontrados en NaE en cuanto a tiempos de retención. Cada uno de estos se analizó con el detector de arreglo de diodos y se obtuvieron los espectros UV que se muestran como insertos de la **Figura 3.2: pico I** (tr = 15,43 min, λ_{max} 291 nm), **pico II** (tr = 16,75 min, λ_{max} 271–335 nm), **pico III** (tr = 17,85 min, λ_{max} 272–334 nm), **pico IV** (tr = 19,77 min, λ_{max} 282 nm). En particular los picos II y III

presentaron un espectro compatible con flavonoides. No se observaron tiempos de retención ni espectros compatibles con los estándares probados previamente.

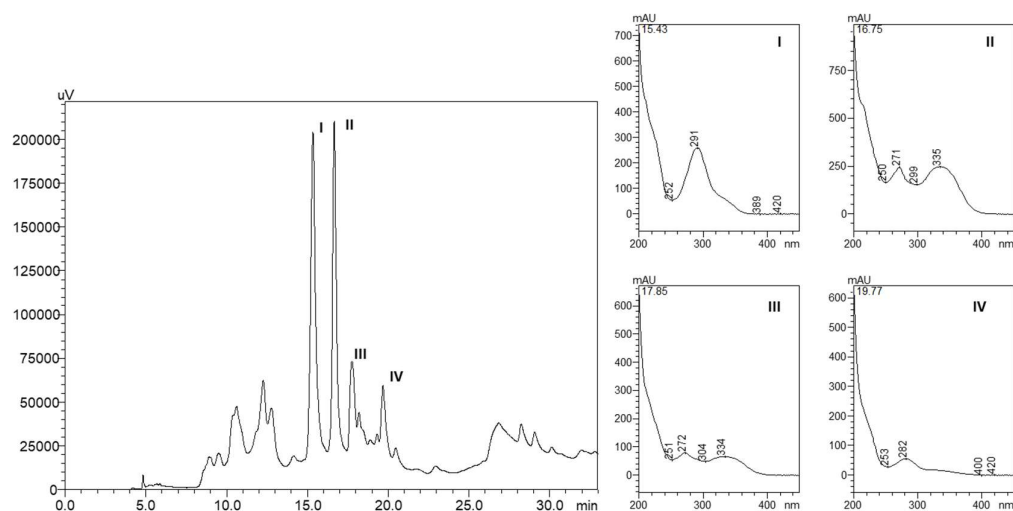


Figura 3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de CpE a 280 nm y espectro UV obtenido con un detector de arreglo de diodos (DAD). El análisis cromatográfico del extracto entero revela la presencia de cuatro picos intensos cuyos espectros UV se detallan en la figura. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

3.3. Fraccionamiento y caracterización de componentes presentes en los extractos

3.3.1. Fraccionamiento de NaE por cromatografía FLASH y análisis por TLC

Cada uno de los tubos colectados durante el fraccionamiento se evaluaron por TLC y luego de analizar su perfil cromatográfico pos revelado, con UV a 254 nm, 365 nm y aspersion con reactivo universal *p*-anisaldehído sulfúrico, se reunieron los de perfil similar y obtuvieron 9 fracciones. En la **Tabla 3.1** se presentan los rendimientos obtenidos (considerando el peso seco por eliminación de solvente con rotavapor) de las fracciones.

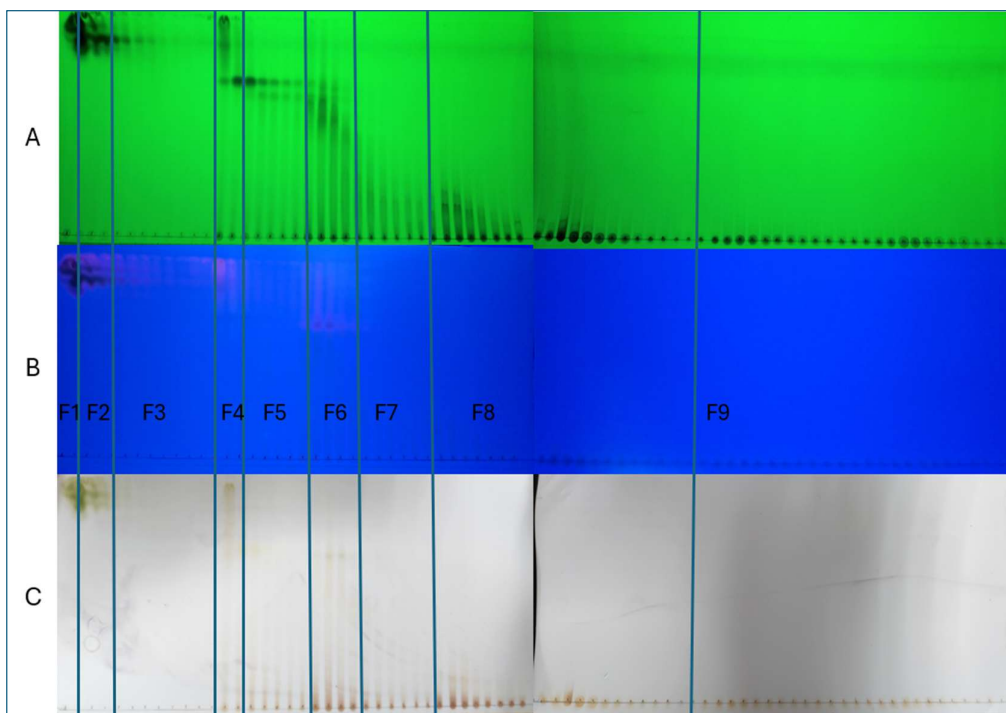


Figura 3.3. Cromatografía en placa delgada de los tubos obtenidos por cromatografía FLASH y constitución de fracciones. Para el análisis se utilizó exposición de la placa a UV 254 nm (A), 365 nm (B) y tinción con *p*-anisaldehído sulfúrico (C). Solvente acetato de etilo: metanol (8:2).

Posteriormente, con las nueve fracciones separadas, se realizó una TLC con un sistema de elución diferente y reveladas con el reactivo específico difenilborónico 2-aminoetil éster (**Figura 3.4**). Estas condiciones y el revelador favorecen la detección de flavonoides glicosilados.

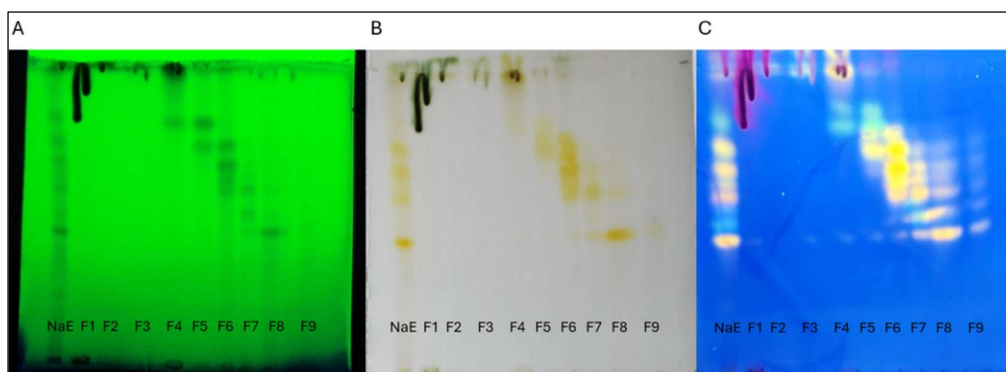


Figura 3.4. Cromatografía en placa delgada de NaE y sus fracciones con la mezcla de solventes acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:27). **A.** Observación a 254 nm sin tinción. **B.** Observación luego de tinción con DPBA. **C.** Observación a 365 luego de tinción con DPBA.

La observación inicial acerca de las características químicas observadas en las cromatografías indica que la clorofila presente en el extracto saldría principalmente en las primeras 3 fracciones en el frente de corrida (mancha color verde opaco en frente de corrida de las **Figuras 3.3 y 3.4**). Los flavonoides se observaron a partir de la fracción 4, en color rojizo con el *p*-

anisaldehído sulfúrico y de colores amarillos en el visible de DPBA. En cuanto a la visualización a 365 nm con el reactivo DPBA se observaron colores verdosos, naranjas y naranjas-amarillentos.

Tabla 3.1. Rendimientos obtenidos por fracción a partir de NaE

Nombre de la fracción	Peso en gramos (g)	Rendimiento
F1	0,0831	16,5%
F2	0,024	4,8%
F3	0,0367	7,3%
F4	0,0135	2,7%
F5	0,0332	6,6%
F6	0,047	9,4%
F7	0,0285	5,7%
F8	0,1572	31,3%
F9	0,102	20,3%

3.3.2. Actividad antioxidante de las fracciones de *N. angustifolia*

Posteriormente, las fracciones obtenidas de *N. angustifolia* se analizaron en función de su poder antioxidante por el ensayo de DPPH (**Figura 3.5**). Se observa un valor mayor de esta propiedad en las fracciones F4 a F8, siendo F5 y F6 las fracciones que conservan una propiedad antioxidante sin diferencias significativas con la del extracto entero.

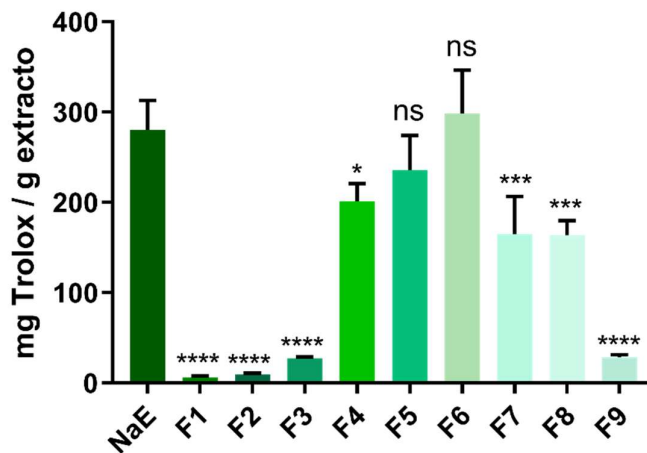


Figura 3.5. Poder antioxidante de las fracciones de *N. angustifolia* por DPPH expresado en relación con un estándar de trolox. NaE representa el extracto entero. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Análisis estadístico en comparación con el extracto entero por ANOVA (ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

3.3.3. HPLC-DAD fracciones *N. angustifolia*

Adicionalmente, las fracciones de *N. angustifolia* se analizaron usando HPLC-DAD. Los perfiles obtenidos por la corrida se pueden observar en la **Figura 3.6**.

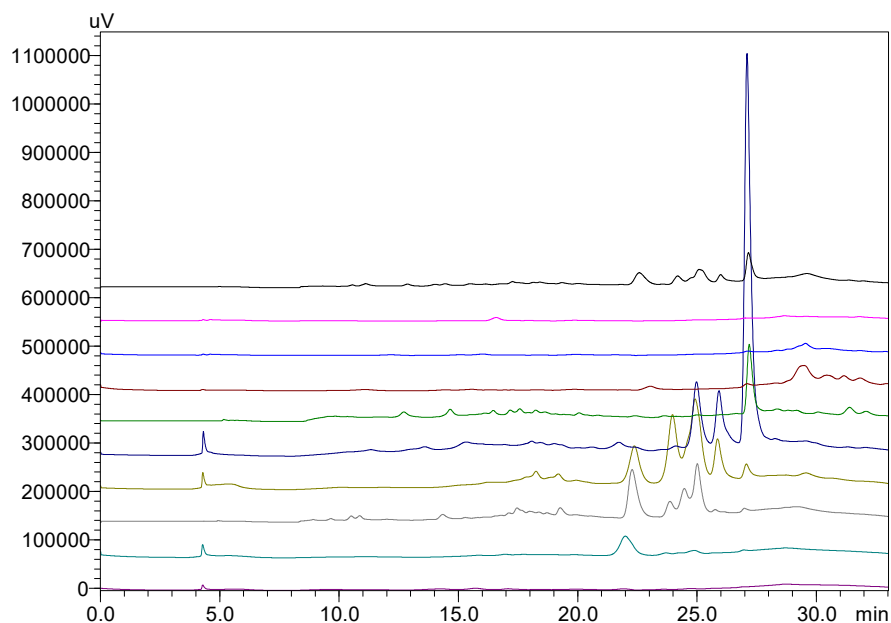
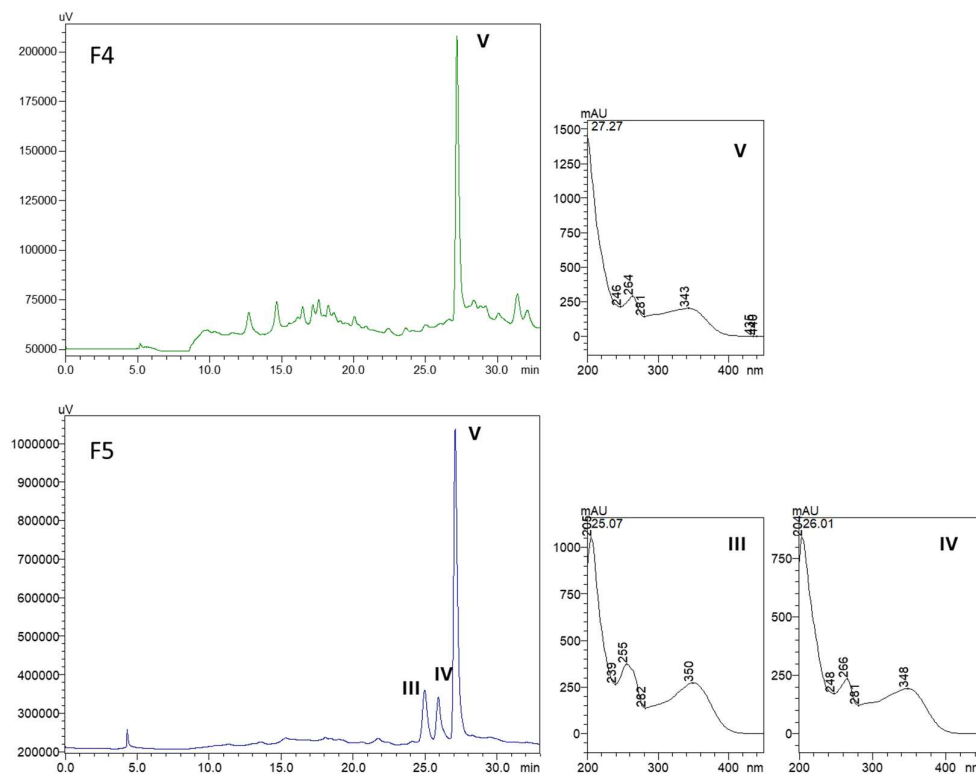


Figura 3.6. Cromatograma superpuesto del extracto entero de *Nectandra angustifolia* y cada una de sus fracciones. De arriba abajo, extracto entero (Negro), F1 (Rosa), F2 (Azul), F3 (Marrón), F4 (Verde), F5 (Azul oscuro), F6 (verde musgo), F7 (Gris), F8 (Turquesa), F9 (Morado). Cromatogramas observados a 280 nm. En las fracciones F4 a F8 se observan los picos con espectro compatible con flavonoides. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.



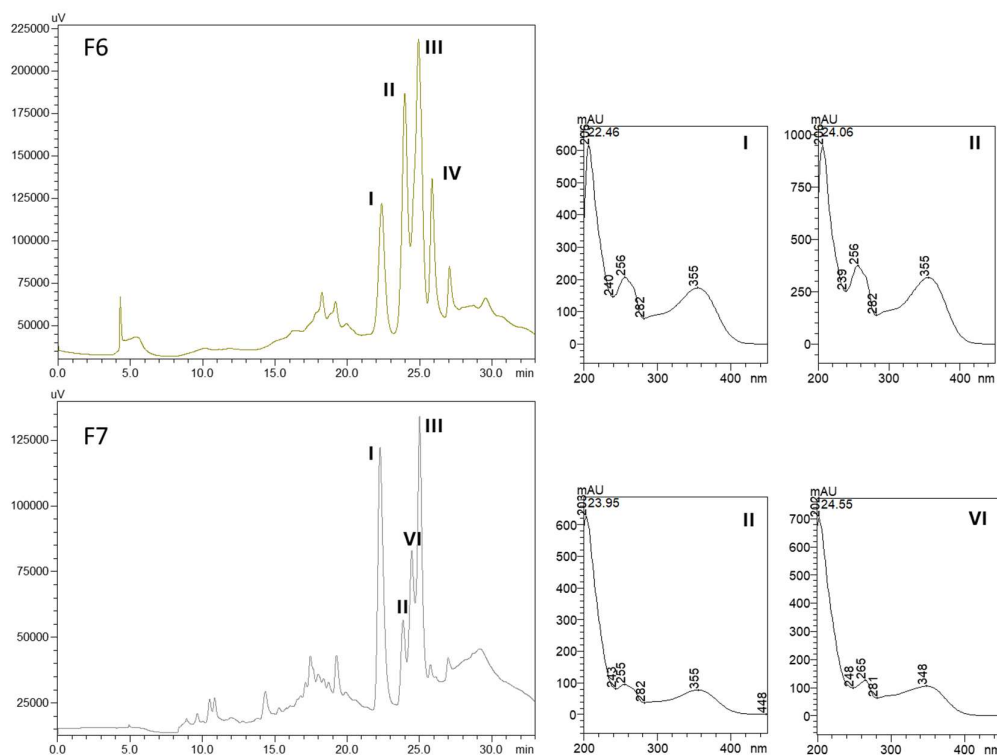


Figura 3.7. Cromatograma a 280 nm de las fracciones de la figura 3.6, F4 (Verde), F5 (Azul oscuro), F6 (verde musgo), F7 (Gris). Se muestran los espectros DAD de los picos compatibles con flavonoides siguiendo la nomenclatura utilizada para NaE. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

3.3.4. Obtención en bache de fracciones de NaE

El bajo rendimiento de fracciones bioactivas ricas en flavonoides y los alentadores resultados en su actividad condujeron a la necesidad de aislamiento de nuevas fracciones F4, F5 y F6. Se realizaron 4 separaciones en columna de sílica gel flash, tal como se describió previamente y luego las fracciones recolectadas se agruparon. Las nuevas fracciones así recolectadas se sometieron a una cromatografía en placa delgada (**Figura 3.8**) y a una caracterización por HPLC-DAD (**Figura 3.9**). Se decidió incluir a la fracción 9 para posteriores pruebas de bioactividad en una matriz con relativa baja cantidad de flavonoides.

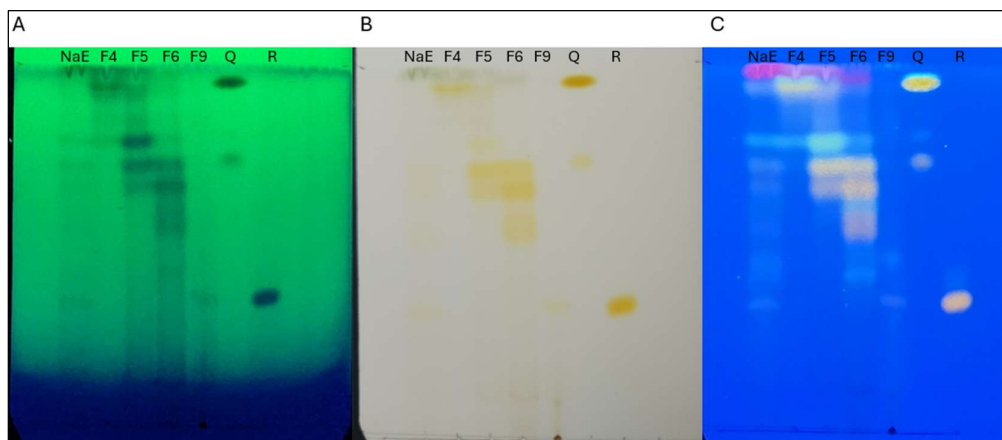


Figura 3.8. Cromatografía en placa delgada de NaE, fracciones F4, F5, F6 y F9 obtenidas en bache y estándares de quercetina (Q) y rutina (R), con la mezcla de solventes acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:27). **A.** Observación a 254 nm sin tinción. **B.** Observación luego de tinción con DPBA. **C.** Observación a 365 luego de tinción con DPBA.

La mezcla de solventes utilizada para separar los flavonoides glicosilados fue extraída de la literatura (Debenedetti, 2016; Heinrich et al., 2018). Tal como se comprueba en la figura se logra una separación adecuada de los mismos con los no glicosilados en el frente de corrida.

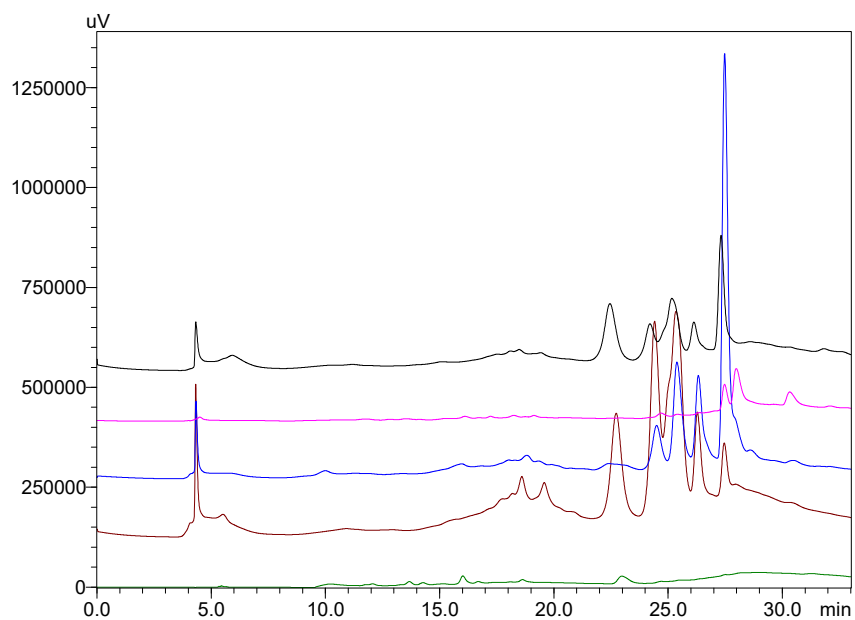


Figura 3.9. Cromatograma superpuesto del extracto entero de *Nectandra angustifolia* y sus nuevas fracciones. De arriba abajo, extracto entero (Negro), F4 (Rosa), F5 (Azul), F6 (Marrón), F9 (Verde). Cromatogramas observados a 280 nm.

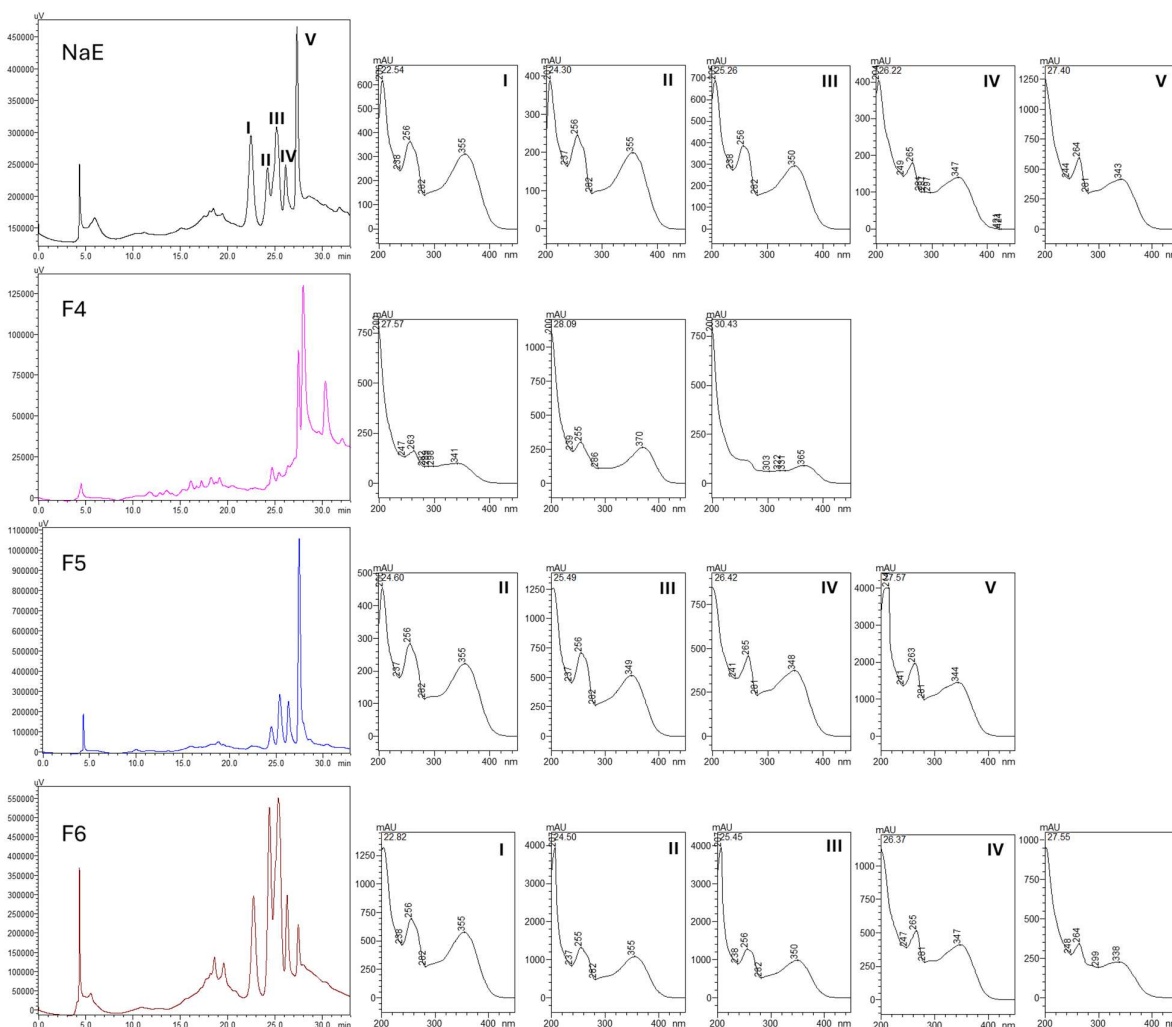


Figura 3.10. Cromatograma superpuesto del extracto entero de *Nectandra angustifolia* y sus nuevas fracciones. De arriba abajo, extracto entero (Negro), F4 (Rosa), F5 (Azul), F6 (Marrón), F9 (Verde). Cromatogramas observados a 280 nm. Se muestran los espectros DAD de los picos compatibles con flavonoides siguiendo la nomenclatura utilizada para NaE.

Si se comparan las cromatografías de las nuevas fracciones obtenidas con las de la **Figura 3.7** se pueden observar los cambios presentados. Principalmente en la F4 que aparecen tres compuestos mayoritarios, el espectro del compuesto con tr 27,57 min coincide con el del pico V, pero no es el mayoritario como en el fraccionamiento anterior. Los otros compuestos que aparecen en el espectro no se han detectado en el fraccionamiento previo. De acuerdo con el perfil HPLC-DAD, la fracción 5 ahora corresponde a una mezcla de la F4 y F5 del primer fraccionamiento.

3.3.5. Fraccionamiento de CpE por cromatografía flash y análisis por TLC

Los tubos colectados por el fraccionamiento se analizaron por TLC y se obtuvieron 6 fracciones, de acuerdo con el perfil cromatográfico con revelado UV a 254 nm, 365 nm y aspersion con *p*-anisaldehído sulfúrico.

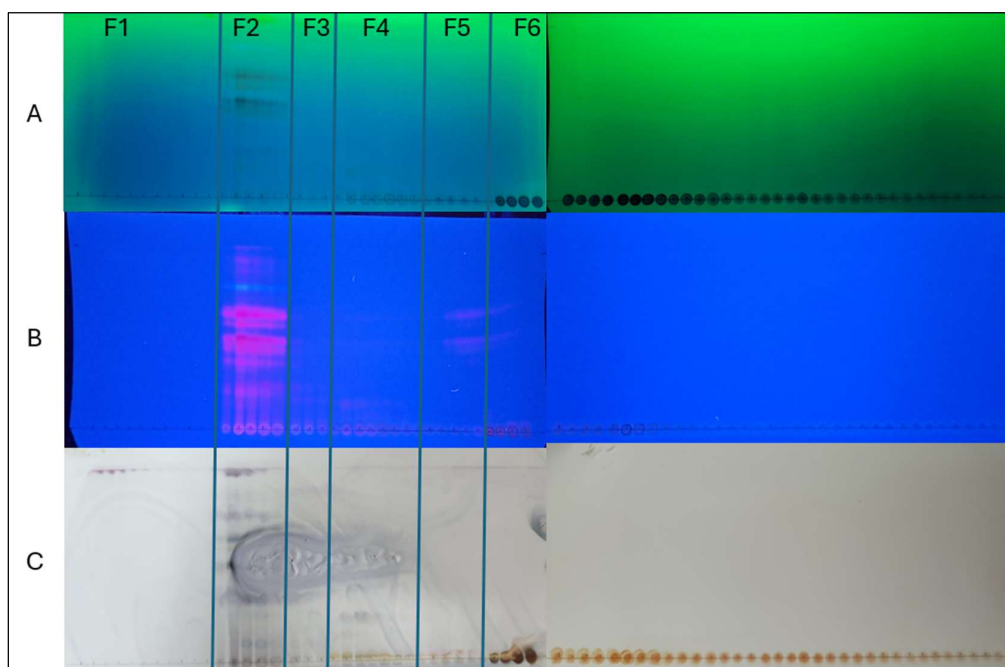


Figura 3.11. Cromatografía en placa delgada de los tubos obtenidos por cromatografía FLASH y constitución de fracciones. Para el análisis se utilizó exposición de la placa a UV 254 nm (A), 365 nm (B) y tinción con *p*-anisaldehído sulfúrico (C). Solvente tolueno: acetato de etilo (9:1).

En la F1 se observó apenas una mancha visible en el frente de corrida, para F2 se encuentran compuestos separados a lo largo de la placa que por el solvente utilizado y las características al UV 365 probablemente sea clorofila. Terminada la elución de los compuestos de F2, se delimita F3 hasta que comienza la elución de un nuevo compuesto con F4. En F5 se denota un cambio en el color del punto de siembra con *p*-anisaldehído en comparación con F4. Ya para F6 se aprecia un tono rojizo en el punto de siembra con *p*-anisaldehído y aparición en UV 254 nm.

Tabla 3.2. Rendimientos obtenidos por fracción a partir de CpE

Nombre de la fracción	Peso en gramos	Rendimiento
F1	0,0275	5,5%
F2	0,0622	12,4%
F3	0,0037	0,7%
F4	0,0096	1,9%
F5	0,0032	0,6%
F6	0,3975	79,5%

De los resultados mostrados en la **Tabla 3.2** se observa que la F6 comprende la mayor parte del extracto con rendimientos muy bajos para las otras fracciones.

3.3.6. Caracterización de fracciones de *C. pareira*

Las fracciones obtenidas se analizaron en función de su poder antioxidante por el ensayo de DPPH. Como se observa en la **Figura 3.12**, ninguna de las fracciones obtenidas mejora o iguala la capacidad antioxidante del extracto entero, no obstante, la actividad se concentra principalmente en las fracciones 4, 5 y 6.

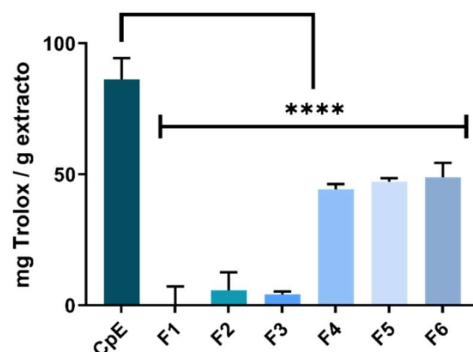


Figura 3.12. Poder antioxidante de las fracciones de *C. pareira* por DPPH expresado en relación con un estándar de trolox. CpE representa el extracto entero. Se observa un valor mayor de esta propiedad en las fracciones F4 a F6. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. Análisis estadístico en comparación con el extracto entero por ANOVA (**** $p < 0,0001$).

3.3.7. HPLC-DAD de las fracciones de *C. pareira*

Las fracciones de CpE se corrieron utilizando el equipo de HPLC-DAD, los cromatogramas obtenidos a 280 nm se grafican en la **Figura 3.13**, y se muestra las fracciones obtenidas de F1 a F6.

La fracción F6 comprende los picos mayoritarios observados en la **Figura 3.2**, ha de destacarse que la F6 presentada en el gráfico 3.13 corresponde a una preparación inmediatamente previa a la corrida cromatográfica, de lo contrario se observaría como la presentada en la **Figura 3.14**. Interesantemente F4 presenta un pico con t_r 29,01 min y λ_{max} 270 – 335 siendo así compatible con un compuesto de la familia de flavonoides el cual no se podía observar en el extracto entero debido a su baja concentración.

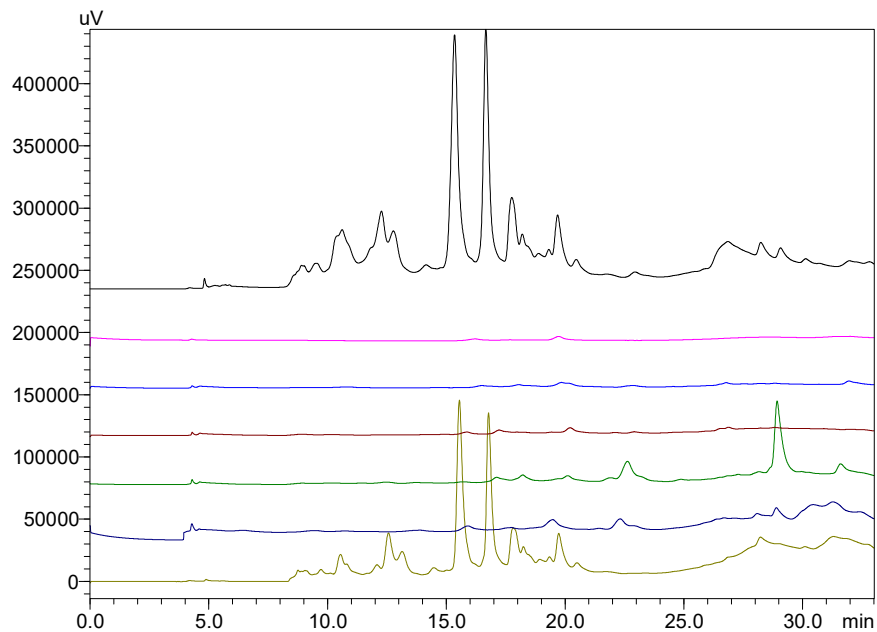


Figura 3.13. Cromatograma superpuesto de las fracciones de *Cissampelos pareira*. De arriba abajo, extracto entero (Negro), F1 (Rosa), F2 (Azul), F3 (Marrón), F4 (Verde), F5 (Violeta), F6 (Verde musgo). Cromatogramas observados a 280 nm.

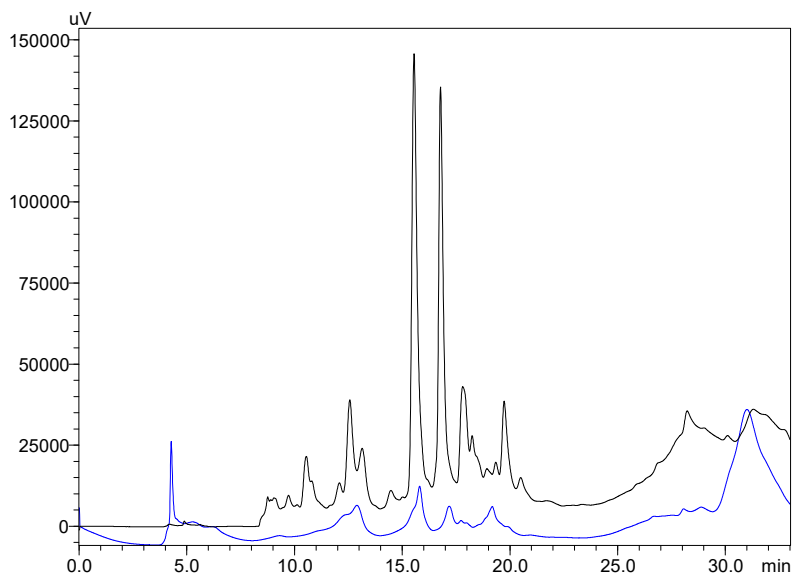


Figura 3.14. Cromatograma superpuesto de F6 de CpE. En negro puede observarse la muestra preparada en el momento de la corrida mientras que en azul una muestra que ha pasado 1 h disuelta a temperatura ambiente. Cromatogramas observados a 280 nm.

La obtención de estos resultados planteó la posibilidad de que ocurra el mismo efecto en el extracto entero por lo que se disolvió en metanol y se corrió en el equipo en el momento y a los 30 minutos obteniéndose la **Figura 3.15**.

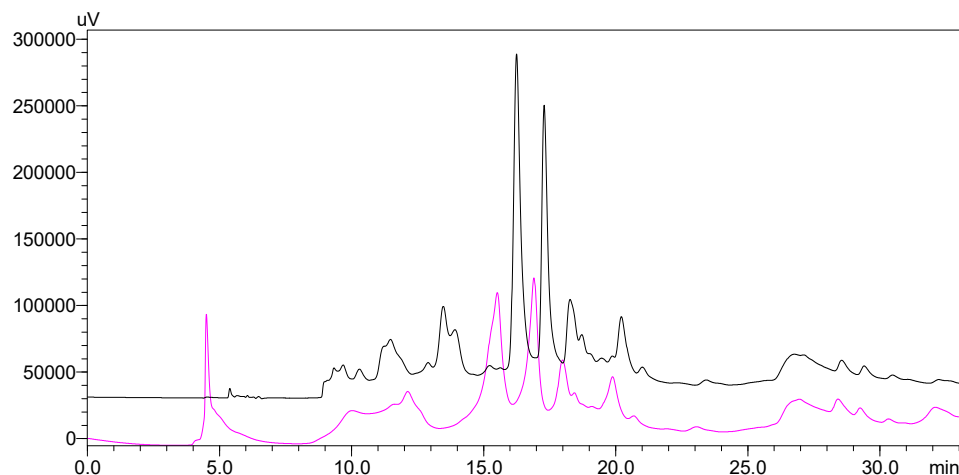


Figura 3.15. Cromatograma superpuesto de CpE. En negro puede observarse la muestra preparada en metanol el momento de la corrida mientras que en rosado una muestra que ha pasado 30 min disuelta en metanol a temperatura ambiente. Cromatogramas observados a 280 nm.

Para comprobar el efecto en un solvente aprótico como el DMSO se repitió el experimento utilizándolo como disolvente.

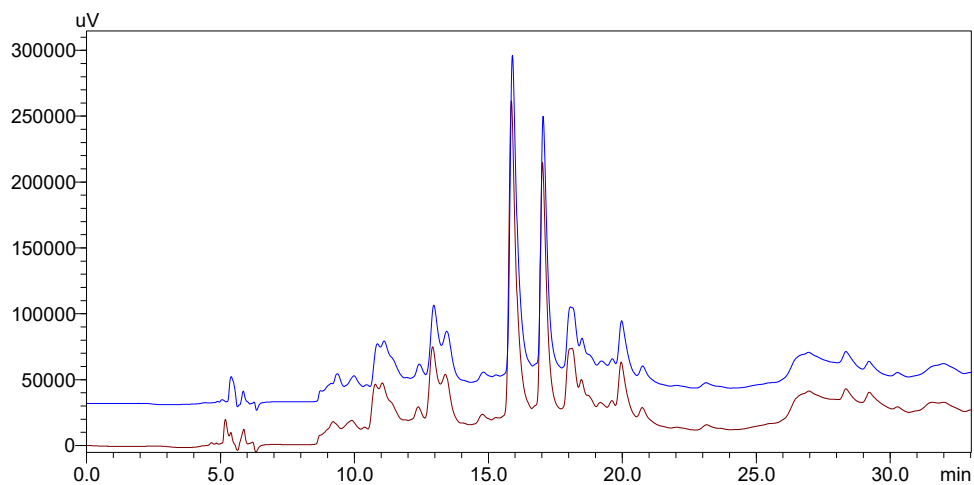


Figura 3.16. Cromatograma superpuesto de CpE. En azul puede observarse la muestra preparada en el momento de la corrida en DMSO mientras que en marrón una muestra que ha pasado 30 min disuelta en DMSO a temperatura ambiente. Cromatogramas observados a 280 nm.

3.3.8. HPLC preparativo *N. angustifolia*

La adquisición de un cromatógrafo de tipo preparativo posibilitó el fraccionamiento de NaE utilizando esta técnica. Considerando los resultados previos obtenidos con el HPLC analítico, se utilizó una columna C18 5 μ m, 250 mm x 14 mm Shim-pack (Shimadzu®), y luego de una puesta punto, se reemplazó el ácido utilizado para la fase acuosa por fórmico, evitando la formación de sales. Así la fase móvil A usada fue de 0,1% de ácido fórmico en agua y la fase B metanol. El perfil de

corrida fue el mismo que el utilizado en el HPLC analítico, comenzando por 70% A y 30% B. Para iniciar el fraccionamiento, 800 mg de NaE se disolvieron en 4 mL de etanol absoluto.

La colección de los picos se realizó en base al cambio de la pendiente por el software del equipo quedando así delimitados 8 picos mayoritarios, compatibles con los encontrados previamente, entre los tiempos 17,5 y 26 min.

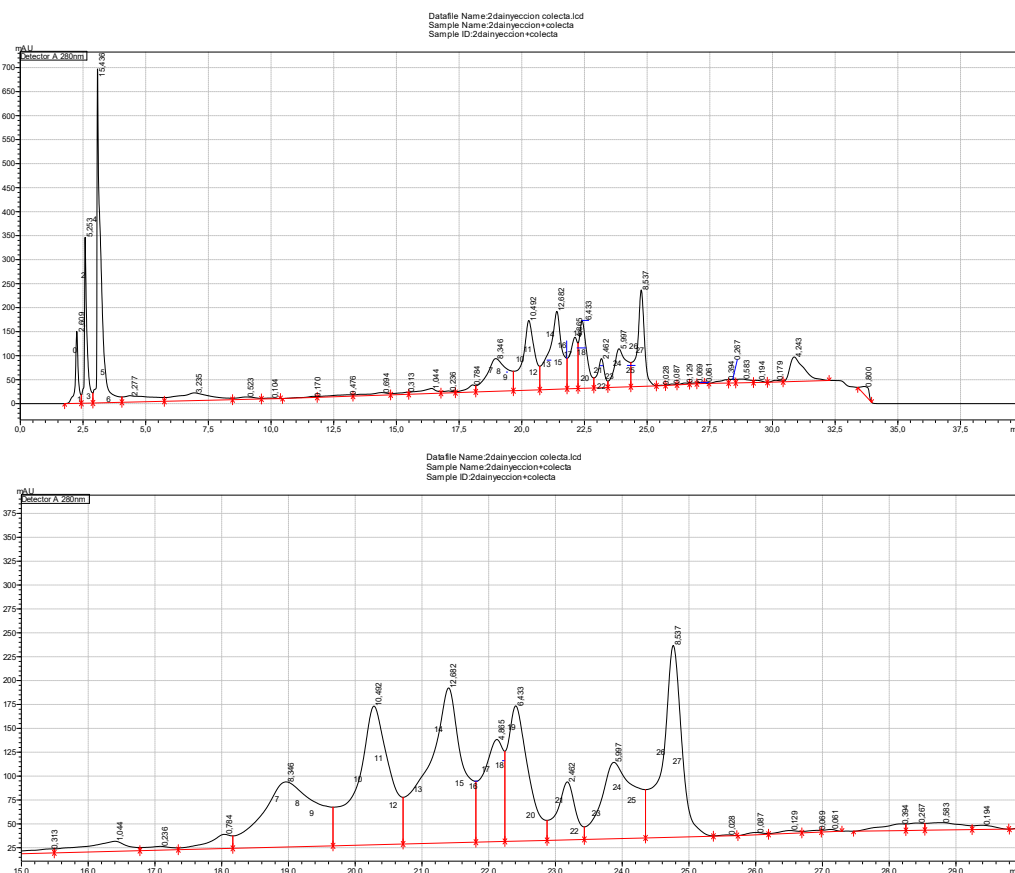


Figura 3.17. Cromatograma a 280 nm y cromatograma ampliado (min 15 a 25). Se observan 8 picos mayoritarios en tiempos de retención compatibles con los previamente hallados.

El detector acoplado al HPLC preparativo permite la detección de una única longitud de onda, por lo que para obtener las longitudes de onda máximas de absorción de los picos purificados y compararlos con los obtenidos en el HPLC analítico se procedió a su lectura en la lectora de microplacas Multiskan Skyhigh con una microplaca UV. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.3.**

Tabla 3.3. Tiempos de retención y longitudes de onda máximas en metanol de picos de NaE

Pico	Tr (min)	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)
1	18,9	255	354
2	20,3	256	354
3	21,5	257	351
4	22,2	264	346
5	22,5	264	347
6	23,2	265	344
7	23,9	264	340
8	24,8	264	342

DISCUSIÓN

El género *Nectandra* posee diferentes metabolitos secundarios descriptos como alcaloides, lignanos, terpenoides, fenilpropanoides y flavonoides (Grecco et al., 2016). En cuanto al extracto etanólico de hojas de *N. angustifolia*, hay reportes de la presencia de flavonoides, glicósidos y triterpenos/esteroides (Bertucci et al., 2008); además de trabajos previos realizados por la Dra. Torres. Dentro del género *Cissampelos* se han explorado fitoquímicamente pocas especies, principalmente se encuentran constituyentes de la familia de los alcaloides, sin embargo en las partes aéreas predominan los flavonoides y pectinas (Semwal et al., 2014). En particular las partes aéreas de *C. pareira*, poseen mayoritariamente flavonoides como amentoflavona, kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosido y cissampeloflavona (Kumari et al., 2021); no obstante para el extracto etanólico trabajado, la Dra. Ricciardi ha reportado la presencia de quercetin-3-O-soforósido, naringenina-7-O- β -D-glucósido, eriodictiol-7-O- β -D-glucósido, galangina-7-glucósido y oroxina A (Ricciardi Verrastro et al., 2018). Es así como el foco del estudio se basó en esta familia de compuestos polifenólicos.

Nectandra angustifolia

En la actividad antioxidante, generalmente se considera que el radical DPPH es más específico que el FRAP para evaluar la actividad asociada a los compuestos polifenólicos (Dudonné et al., 2009). En el análisis de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante de NaE y CpE se observó un mejor rendimiento por gramo de extracto seco para NaE. Los resultados aquí obtenidos son ligeramente superiores a los reportados para otras especies como *Nectandra falcifolia* (Borghi-Pangoni et al., 2015) y podrían ser consecuencia de la composición fitoquímica particular de cada muestra y/o atribuidos a variaciones edafológicas.

En cuanto a la detección de flavonoides, el DPBA representa un método con especificidad restringida, ya que puede reaccionar con flavonoides, ácido cafeico y otros, en distintas tonalidades. Si bien esto no asegura la familia de compuestos, puede proporcionar una primera idea. En este sentido, Debenedetti establece que flavonoides glicosilados que reaccionan dando color amarillo naranja con el DPBA a 365 nm, podrían ser derivados de quercetina y miricetina dentro de la familia de flavonoles. Asimismo, dentro de las flavonas, los glicósidos de luteolina también dan color naranja mientras que flavonoles glicosilados como kaempferol e isorhamnetina dan colores amarillo verdosos al igual que los derivados glicosilados de apigenina. Este reactivo además intensifica la fluorescencia de cumarinas y para ácidos carboxílicos fenólicos produce fluorescencia azul o azul verdosa. Además, también produce fluorescencia de antraquinonas en naranja (c-glicósidos) o rojo (agliconas u o-glicósidos) (Debenedetti, 2016).

Es interesante notar que en el extracto entero de *N. angustifolia* aparecen un mayor número de bandas en la TLC (**Figura 3.4 C y Figura 3.8 C**) que picos por HPLC-DAD atribuidos a flavonoides (**Figura 3.1 A**), lo cual indicaría la presencia de otros flavonoides que serían responsables de los

picos anchos observados en el cromatograma. Considerando lo mostrado en la **Figura 3.8** en cuanto al R_f de rutina y del compuesto en la F9, que también aparece en el extracto entero, y el pico I del cromatograma de la **Figura 3.1 A** se podría aseverar que el compuesto observado corresponde a la rutina. Esta hipótesis cobra mayor relevancia al considerar los resultados recientes publicados por la Dra. Torres sobre el extracto de *Nectandra angustifolia* donde se demuestra la existencia de rutina en una fracción del mismo por espectrometría de masas (Torres et al., 2023). En este último, se muestra que en una fracción de NaE se encuentran además otros derivados de quercetina glicosilada en la posición 3 con galactósido, rhamnósido o neohesperidósido. Asimismo, otros autores han reportado derivados glicosilados de quercetina, apigenina, luteolina (de S. Farias et al., 2018); rhamnósidos de kaempferol, miricetina y quercetina (Da Silva et al., 2018); derivados glicosilados de kaempferol y quercetina (Macías-Villamizar et al., 2015; Oliveira et al., 2018). Para determinar las identidades químicas exactas de los compuestos presentes en el extracto será necesario utilizar cromatografía líquida acoplada a detectores de masas y realizar estudios de resonancia magnética nuclear con los picos purificados.

La obtención de fracciones de NaE mediante cromatografía en columna con sílica gel flash siguiendo el protocolo establecido por la Dra. Torres, ha permitido aislar 9 fracciones. Pequeñas variaciones entre corridas producen modificaciones entre las fracciones, mayoritariamente en la F4 que eluye en 1 o 2 tubos, lo que hace que una ligera variación afecte su perfil y, consecuentemente, el de la F5. Esto resulta en un patrón de fracciones no completamente reproducible; además, los compuestos presentes no logran aislarse o enriquecerse totalmente en una fracción única. Esto plantea la posibilidad de usar el flash como una primera etapa de purificación, incluso se podrían acelerar los cambios de solventes para lograr concentrar los flavonoides glicosilados en menor tiempo y luego partir de una única fracción rica en los mismos. Teniendo en cuenta la escalabilidad de un producto, las fracciones por separado muestran rendimientos bajos, particularmente las que presentan un mayor poder antioxidante (**Figura 3.5**) y bioactividad (ver **capítulos III y V**) con rendimientos inferiores al 10% (**Tabla 3.1**). Estas fracciones con capacidad antioxidante son las que presentan picos compatibles con flavonoides (**Figura 3.7 y Figura 3.8**) lo cual es esperado en este tipo de compuestos polifenólicos.

La capacidad separativa de una cromatografía flash para compuestos con similitudes estructurales es limitada, como se puede observar en las figuras de los cromatogramas tanto de HPLC como de TLC de las fracciones colectadas. Una forma de aislar los compuestos puros en el orden de miligramos es por el escalado de la técnica de HPLC a uno de tipo preparativo, que gracias a la superficie de la fase estacionaria, tamaño del poro y presión utilizada logra la resolución necesaria (Latif & Sarker, 2012). El aislamiento de los compuestos es un paso necesario para su correcta identificación por técnicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (Heinrich et al., 2018). Las diferencias logradas respecto a la resolución se pueden observar en la aparición de nuevos picos cromatográficos que dan origen a espectros UV y tiempos de retención únicos (**Figura 3.11**). En cuanto a los máximos observados en el UV, existen dos bandas máximas

para los flavonoides, una entre 240 y 285 nm (banda II, anillo A) y otra entre 300 y 400 (banda I, anillo B). Los flavonoles absorben en la banda I entre 352 y 385 por lo general y las glicosilaciones disminuyen estos valores (Markham & Mabry, 1975). Así, los datos hallados para los espectros UV serían compatibles entonces con derivados de quercetina como ha reportado la Dra. Torres (Torres et al., 2023) y con derivados de otros flavonoles como podrían ser glicósidos de kaempferol reportados en el género por otros autores (Da Silva et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Ribeiro et al., 2005).

Cissampelos pareira

El rendimiento obtenido para el extracto etanólico de *C. pareira* varía en gran manera en la bibliografía, hay reportes de hasta 21,3% (Gupta et al., 2011) como de 3,43% (Poudel et al., 2019). El contenido de fenoles totales ($195,85 \pm 10,13$ mg equivalentes de ácido gálico por g de CpE) fue mayor que el reportado por Poudel y col. (2019) ($141,67 \pm 0,009$ mg equivalentes de ácido gálico por g de CpE) como también el contenido de flavonoides totales ($640,38 \pm 57,49$ mg equivalentes de quercetina por g CpE) comparado con el mismo reporte ($405,0 \pm 0,006$ mg equivalentes de quercetina por g CpE) (Poudel et al., 2019), estas variaciones pueden ser atribuidas a diferencias edafoclimatológicas.

Como se ha mencionado previamente la Dra. Ricciardi ha determinado la presencia de compuestos de la familia de flavonoides por medio de un UPLC-MS, en particular derivados glicosilados de flavanonas (eriodictiol y naringenina), flavonas (baicaleína) y flavonoles (quercetina y galangina) (Ricciardi Verrastro et al., 2018). Las diferencias estructurales entre estos compuestos y los encontrados en *N. angustifolia* justificarían las diferencias en los tiempos de retención en el cromatograma de HPLC. En cuanto a las fracciones obtenidas por cromatografía flash representan el mismo número de fracciones, pero difieren en el rendimiento con las determinadas previamente por la Dra. Ricciardi (Ricciardi Verrastro et al., 2018). Como se ha mostrado en la **Figura 3.14**, la fracción 6 presenta un problema de estabilidad que puede explicarse por interacciones con el solvente utilizado ya que al disolver en DMSO (solvente aprótico) no se presentan los mismos problemas que con metanol.

A lo largo del presente capítulo se han analizado las propiedades químicas de los extractos enteros, su fraccionamiento y actividades antioxidantes *in vitro* sin medio biológico involucrado. En los capítulos siguientes se presentan las propiedades biológicas observadas, en particular en el **capítulo IV** se tratarán los experimentos con extractos enteros mientras que se reservan los experimentos con fracciones de los extractos para el **capítulo V**.

CAPÍTULO IV

*Evaluación de las propiedades biológicas de los
extractos enteros por métodos in vivo e in vitro*

RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

Capítulo IV

Evaluación de las propiedades biológicas de los extractos enteros por métodos *in vivo* e *in vitro*

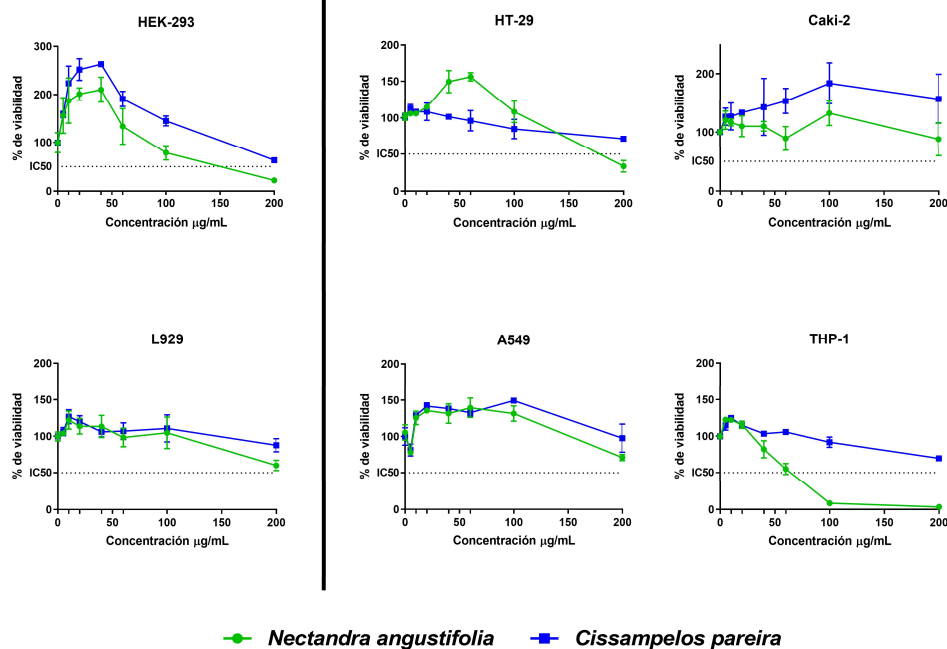
RESULTADOS	68
4.1. Actividad citotóxica en líneas tumorales y no tumorales	68
4.2. Actividad antiinflamatoria en líneas macrofágica murinas	70
4.2.1. Determinación de la concentración de trabajo	70
4.2.2. Inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias.....	71
4.2.3. Inhibición de la translocación de NF- κ B	74
4.3. Actividad antiinflamatoria en modelos <i>in vivo</i>	75
4.4. Efecto antiinflamatorio en línea de microglía murina.....	77
DISCUSIÓN	80
Citotoxicidad contra líneas tumorales humanas	80
Actividad antiinflamatoria.....	81

RESULTADOS

4.1. Actividad citotóxica en líneas tumorales y no tumorales

Dentro de los objetivos de esta tesis se planteó el abordaje de la actividad antitumoral de los extractos de *N. angustifolia* y de *C. pareira*. Para esta tarea se decidió empezar con diferentes líneas tumorales humanas comprobando el efecto citotóxico de los extractos y comparándolos con líneas no tumorales. Entonces, los extractos de *N. angustifolia* y *C. pareira* se probaron en un amplio rango de concentraciones (10 – 200 µg/mL) durante 24 o 48 h y frente a distintas líneas celulares tumorales humanas, A549 (cáncer pulmón), HT-29 (adenocarcinoma de colon), Caki-2 (carcinoma renal de células claras) y THP-1 (leucemia monocítica aguda); y no tumorales HEK-293 (embrionaria renal) y L929 (fibroblasto murino). Posteriormente, se evaluó la capacidad citotóxica de los extractos utilizando el ensayo de XTT (Figura 4.1) siguiendo las recomendaciones del fabricante (para mayor información revisar materiales y métodos Capítulo II)

24 h



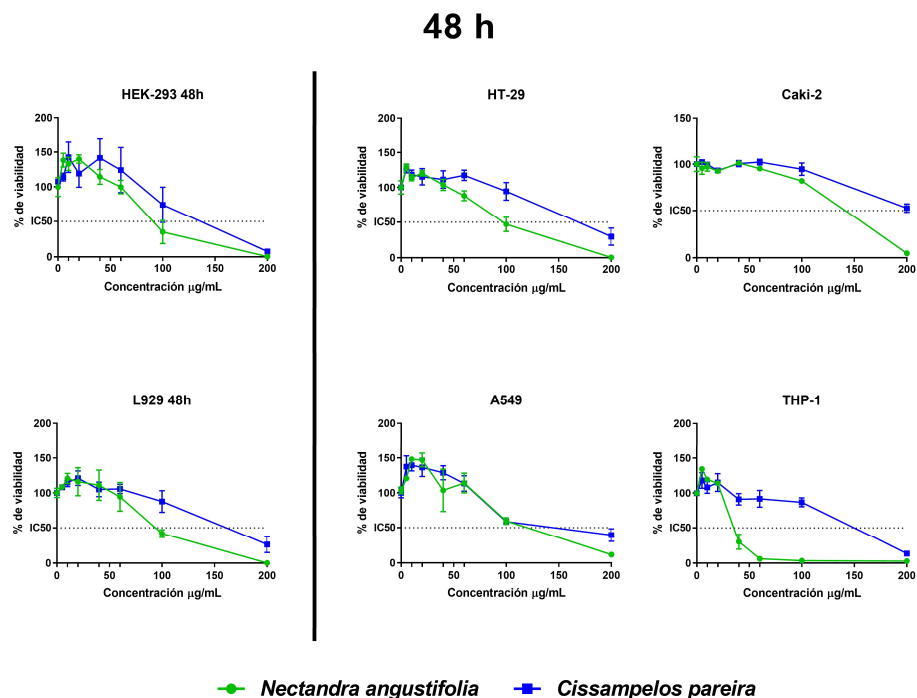


Figura 4.1. Viabilidad celular medida por XTT de distintas líneas tumorales (derecha) y no tumorales (izquierda) expuestas a los extractos etanólicos de *N. angustifolia* y *C. pareira* durante 24 h o 48 h de exposición.

Los valores de IC₅₀ para cada línea se obtuvieron mediante el software GraphPad Prism® graficando el logaritmo de la concentración versus el porcentaje de viabilidad. A modo representativo y por ser el de menor valor obtenido se muestra la actividad de *N. angustifolia* en la línea THP-1 a 48 h (**Figura 4.2**). El resto de los valores obtenidos para IC₅₀ de *N. angustifolia* y *C. pareira* se observan en la **Tabla 1**.

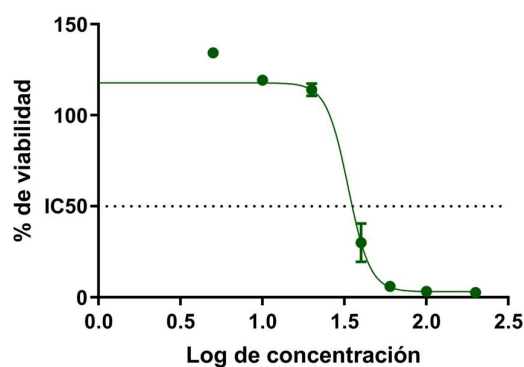


Figura 4.2. Viabilidad celular de la línea THP-1 expuesta a distintas dosis del extracto etanólico de *Nectandra angustifolia* durante 48 h. En el gráfico se muestra la curva de regresión obtenida para las concentraciones utilizadas como una línea continua.

Tabla 4.1. Valores de IC₅₀ obtenidos en diferentes líneas celulares expuestas a extractos enteros de *N. angustifolia* y *C. pareira*

	24 h		48 h	
	NaE	CpE	NaE	CpE
A549	>200 µg/mL	>200 µg/mL	140,6 µg/mL	150 µg/mL
HT29	175 µg/mL	>200 µg/mL	95,44 µg/mL	160 µg/mL
Caki-2	>200 µg/mL	>200 µg/mL	137,9 µg/mL	>200 µg/mL
THP-1	60 µg/mL	>200 µg/mL	33,37 µg/mL	150 µg/mL
HEK-293	150 µg/mL	>200 µg/mL	81,11 µg/mL	109,6 µg/mL
L929	>200 µg/mL	>200 µg/mL	90,1 µg/mL	160 µg/mL

Los resultados obtenidos en las pruebas de citotoxicidad para las distintas líneas tumorales no muestran un efecto citotóxico alto (<20 µg/mL), de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (Nguyen et al., 2020). Por lo que se decidió no explorar su actividad en modelos más complejos como los antitumorales.

4.2. Actividad antiinflamatoria en líneas macrofágica murinas

Además de actividad antitumoral, esta tesis plantea estudiar los efectos antiinflamatorios de los extractos de *N. angustifolia* y *C. pareira*. Resulta de particular interés este efecto biológico para correlacionar con las actividades antiofídicas halladas previamente por el laboratorio de la Dra. Torres (Ricciardi Verrastro et al., 2018; Torres et al., 2011); el efecto de los extractos sobre el sistema inmunológico complementaría esta acción convirtiéndolos en excelentes candidatos ante un accidente ofídico. Como se menciona en la introducción, en un ambiente inflamatorio, los macrófagos son un componente clave del sistema inmunológico, desempeñando un rol fundamental desde la activación de la respuesta hasta su resolución. Por ello, representan un objetivo atractivo para el estudio de los efectos antiinflamatorios. En este caso, para el desarrollo de los experimentos, se seleccionó la línea celular RAW 264.7 de macrófagos murinos.

4.2.1. Determinación de la concentración de trabajo

Primeramente, para determinar las concentraciones de trabajo se realizaron análisis de viabilidad celular tanto por conteo en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripano, como por reducción de XTT para NaE (**Figura 4.3**).

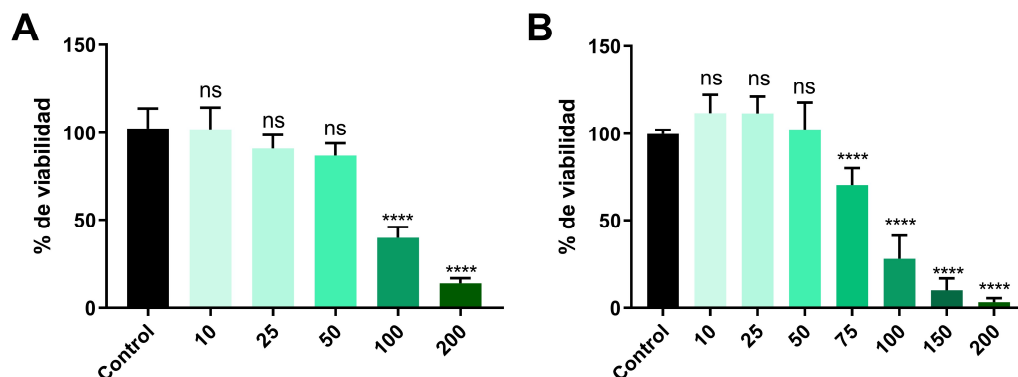


Figura 4.3. Viabilidad celular en línea celular RAW 264.7 expuesta a NaE en diferentes concentraciones (µg/mL) durante 24 h. **A.** Ensayo de azul de tripano. **B.** Ensayo de XTT. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA con el test de múltiples comparaciones de Dunnet (ns: no significativo; **** p < 0.0001).

Posteriormente se realizó un análisis del ciclo celular con diferentes concentraciones de NaE para observar su influencia. Como se detalla en materiales y métodos, las células se cultivaron en monocapas, se trataron con el extracto entero y posteriormente se despegaron y tiñeron con ioduro de propidio. Luego las células prefijadas se analizaron en un citómetro BD FACSCalibur contando 100.000 eventos por tubo con los detectores en escala aritmética. Las poblaciones de estudio se delimitaron con el grupo control (sin tratamiento) y se aplicaron estos parámetros a los diferentes grupos utilizando el software FlowJo® (**Figura 4.4**). Los resultados obtenidos se correlacionan con los de viabilidad al observar la población sub g0/g1 en la concentración de 100 µg/mL, la misma puede deberse a eventos apoptóticos que contengan ADN fragmentado (Darzynkiewicz et al., 2010).

Dado que los resultados obtenidos por las diversas técnicas son concordantes y permiten dilucidar la concentración de trabajo, se optó para la otra especie, *C. pareira* el uso de XTT únicamente.

4.2.2. Inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias

Para el análisis del efecto antiinflamatorio *in vitro* de la mayor concentración no citotóxica de NaE se utilizó como estímulo de reto LPS. Las células fueron preincubadas con NaE por 1 h y luego desafiadas con 1 µg/mL de LPS, en tres tiempos diferentes para analizar el perfil de las citoquinas proinflamatorias en cada punto (4, 8 y 24 h). Los ARN fueron obtenidos, retrotranscritos a ADNc y luego cuantificados por qPCR utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ con el grupo sin tratamiento como referencia y el gen GAPDH como normalizador (**Figura 4.6**).

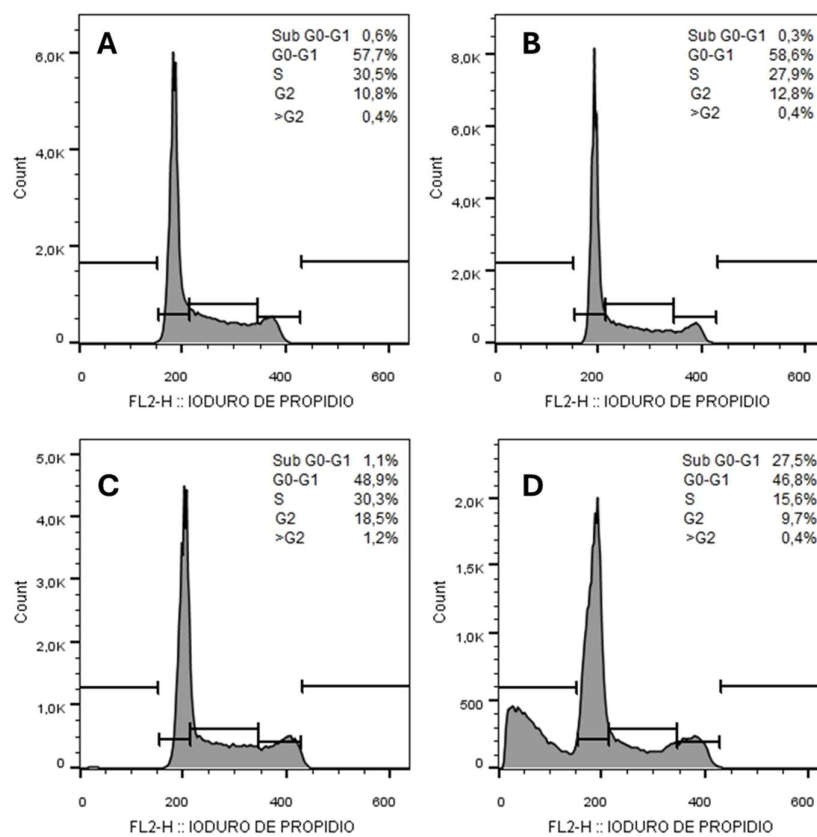


Figura 4.4. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de células RAW 264.7 expuestas a NaE por 24 h utilizando ioduro de propidio (1 mg/mL). **A.** Control. **B.** NaE 10 µg/mL. **C.** NaE 50 µg/mL. **D.** NaE 100 µg/mL. Adquisición de 100000 eventos por tubo. Nótese el incremento de la región Sub G0 con el aumento de la concentración utilizada del extracto. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes.

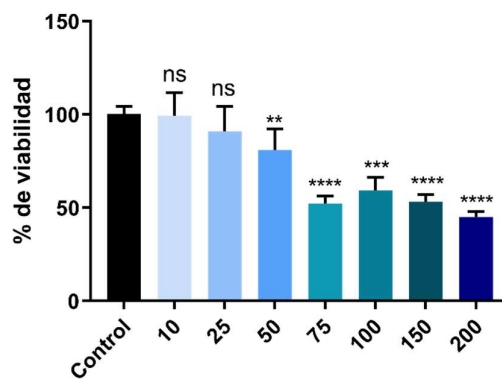


Figura 4.5. Viabilidad celular en línea celular RAW 264.7 expuesta a CpE en diferentes concentraciones (µg/mL) durante 24 h por el ensayo de XTT. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA con el test de múltiples comparaciones de Dunnet (ns: no significativo; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

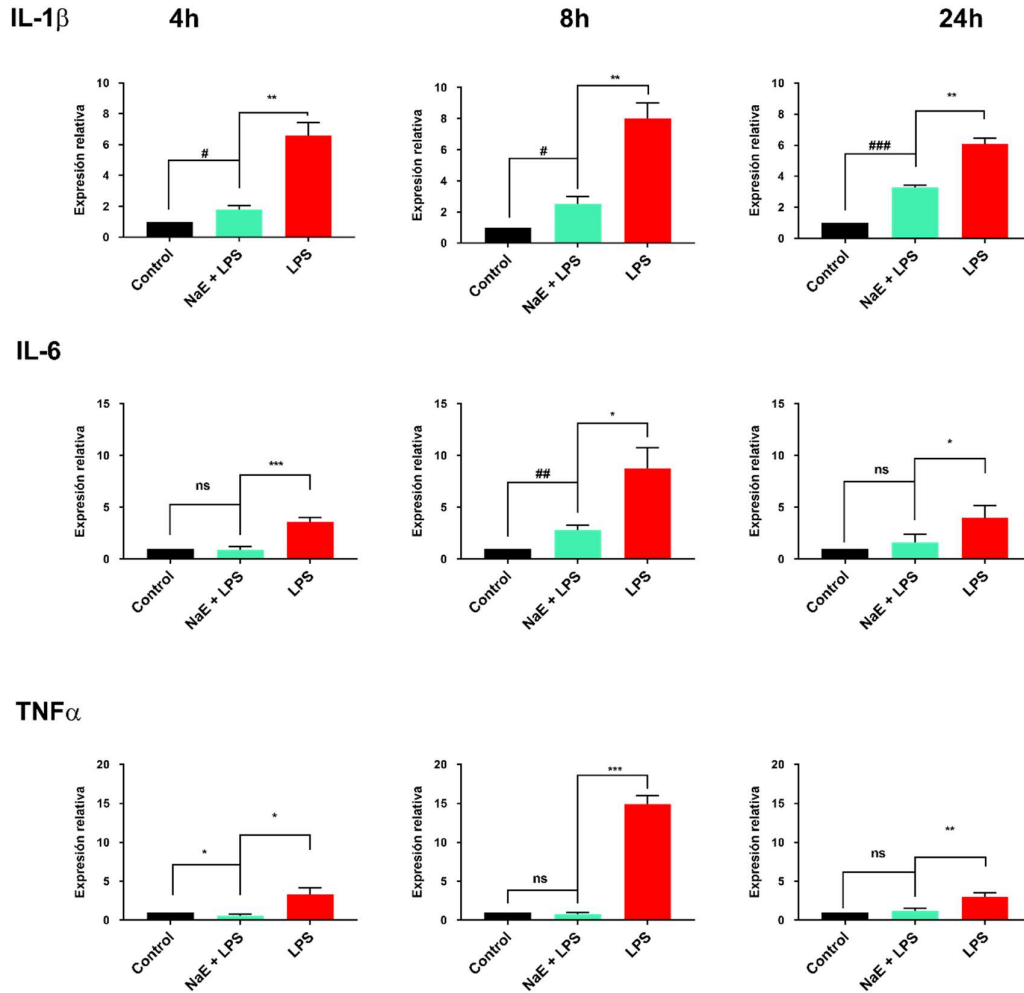


Figura 4.6. Expresión relativa de ARNm de IL-1 β , IL-6 y TNF α en células sin estimular (control), estimuladas con lipopolisacárido (LPS) o pretratadas con NaE 1 h y estimuladas con LPS (NaE + LPS). Los valores fueron calculados utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando como gen de referencia GAPDH. Los datos son presentados como media $\pm$ desvío estándar. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ensayo de *t* de student no pareado con corrección de Welch * indica comparación con el grupo LPS y # con el grupo control (ns: no significativo; #, **p*<0,05; ##, ***p*<0.01; ###, ****p*<0.001).

En consonancia con lo anterior, para analizar el efecto antiinflamatorio de CpE se utilizó la concentración de trabajo 25 μ g/mL tal como se había determinado previamente (**Figura 4.5**) y únicamente se analizó un tiempo de exposición de 8 h.

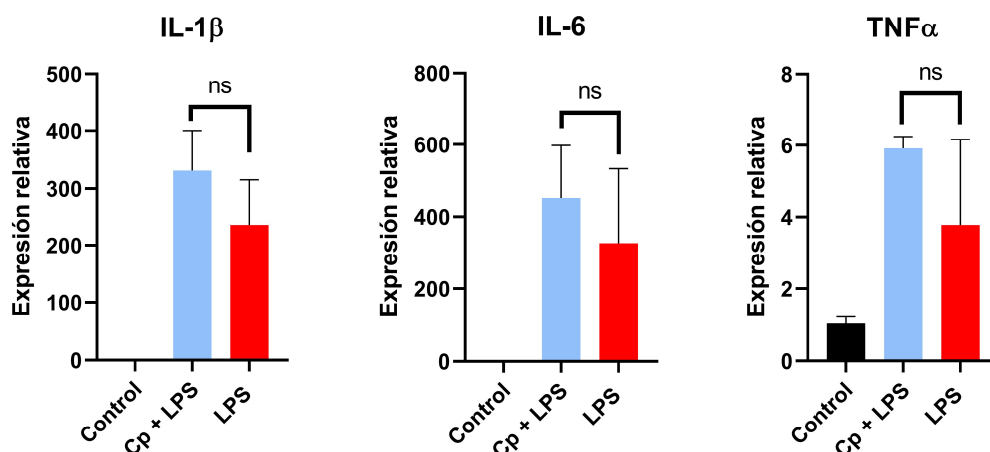


Figura 4.7. Expresión relativa de ARNm de IL-1 β , IL-6 y TNF α en células sin estimular (control), estimuladas con lipopolisacárido (LPS) o pretratadas con CpE 1 h y estimuladas con LPS (CpE + LPS). Los valores fueron calculados utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando como gen de referencia GAPDH. Los datos son presentados como media $\pm$ desvío estándar. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ensayo de *t* de student no pareado con corrección de Welch sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos (ns: no significativo).

Como se puede observar en la figura, en esta concentración de CpE no hay diferencias entre células tratadas con LPS y las que tienen un tratamiento previo de 1 h con el extracto antes del estímulo con LPS. Teniendo en cuenta los resultados conseguidos con *N. angustifolia*, se decidió seguir el abordaje de la actividad antiinflamatoria sólo con NaE.

4.2.3. Inhibición de la translocación de NF- κ B

Dentro de la respuesta inflamatoria por LPS uno de los principales exponentes en la regulación de la expresión de genes es el factor de transcripción NF- κ B. El mismo ejerce su acción al translocarse al núcleo de las células. Habiéndose observado una disminución en la expresión de genes proinflamatorios se decidió su estudio por inmunofluorescencia por colocalización con el marcador nuclear DAPI. Para el mismo se preincubó con NaE durante 1h y luego se estimuló con LPS por 1 h. Se comparó con un grupo sin tratamiento (control negativo) y un grupo estimulado únicamente con LPS por 1 h (control positivo).

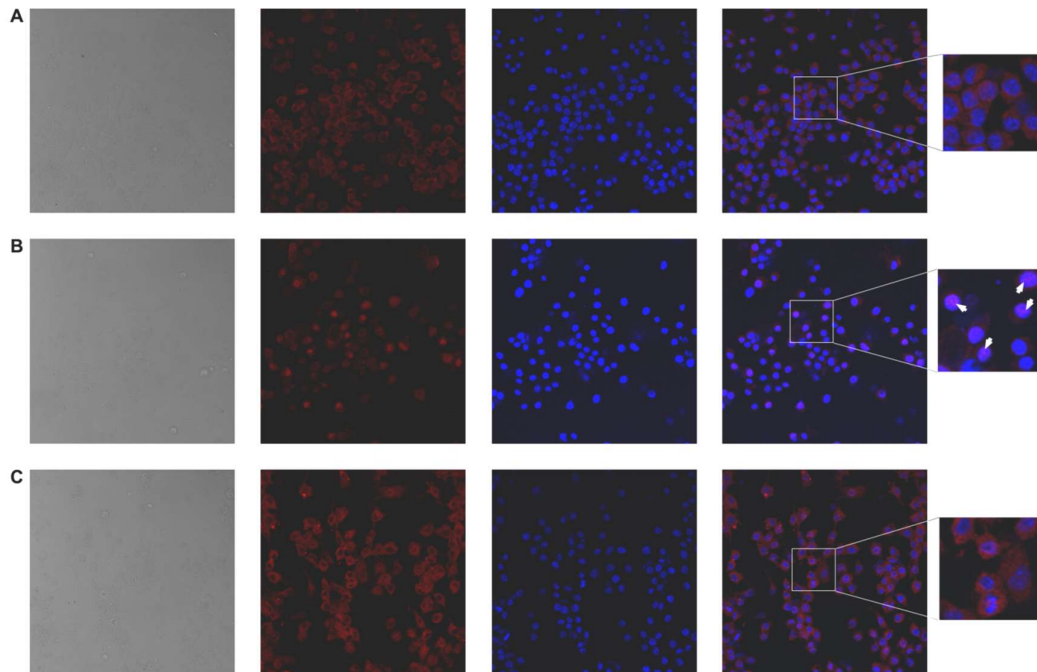


Figura 4.8. Translocación nuclear de la subunidad p65 de NF-κB en células RAW 264.7. **A.** Control. **B.** LPS. **C.** pretratamiento con NaE y posterior tratamiento con LPS. Las flechas indican la presencia nuclear de NF-κB. La coloración nuclear corresponde a DAPI (píxeles azules) mientras que la coloración de la subunidad p65 de NF-κB se realizó con TRITC (píxeles rojos). Las fotos son representativas de tres experimentos independientes y fueron adquiridas con objetivo de 63x.

4.3. Actividad antiinflamatoria en modelos *in vivo*

La correlación de estos datos experimentales *in vitro*, con un modelo de inflamación *in vivo*, otorga a la hipótesis de trabajo mayor robustez. El modelo elegido para tal propósito fue el de inyección de formalina en la almohadilla plantar de ratón. Este modelo presenta una respuesta bifásica al dolor generado, una primera fase neurogénica (primeros 5 minutos) seguida de una fase inflamatoria (15 min después de la inyección), además de generar edema en el sitio de inyección. Se inyectó por vía intraperitoneal dos dosis de NaE 1 h previo al estímulo con formalina, una de 50 mg kg⁻¹ y otra más baja de 5 mg kg⁻¹. Los animales en los grupos control y tramadol recibieron una inyección del vehículo en su lugar. Se utilizó tramadol como control farmacológico del efecto ya que es un anti nociceptivo comprobado. El estímulo se cuantificó con el tiempo que pasaron los ratones lamiéndose la pata inyectada durante las diferentes fases de la respuesta (**Figura 4.9 A y B**) y con el tamaño relativo de la pata inyectada comparada con la pata no inyectada del mismo ratón a la hora posterior a la inyección de formalina (**Figura 4.9 C**).

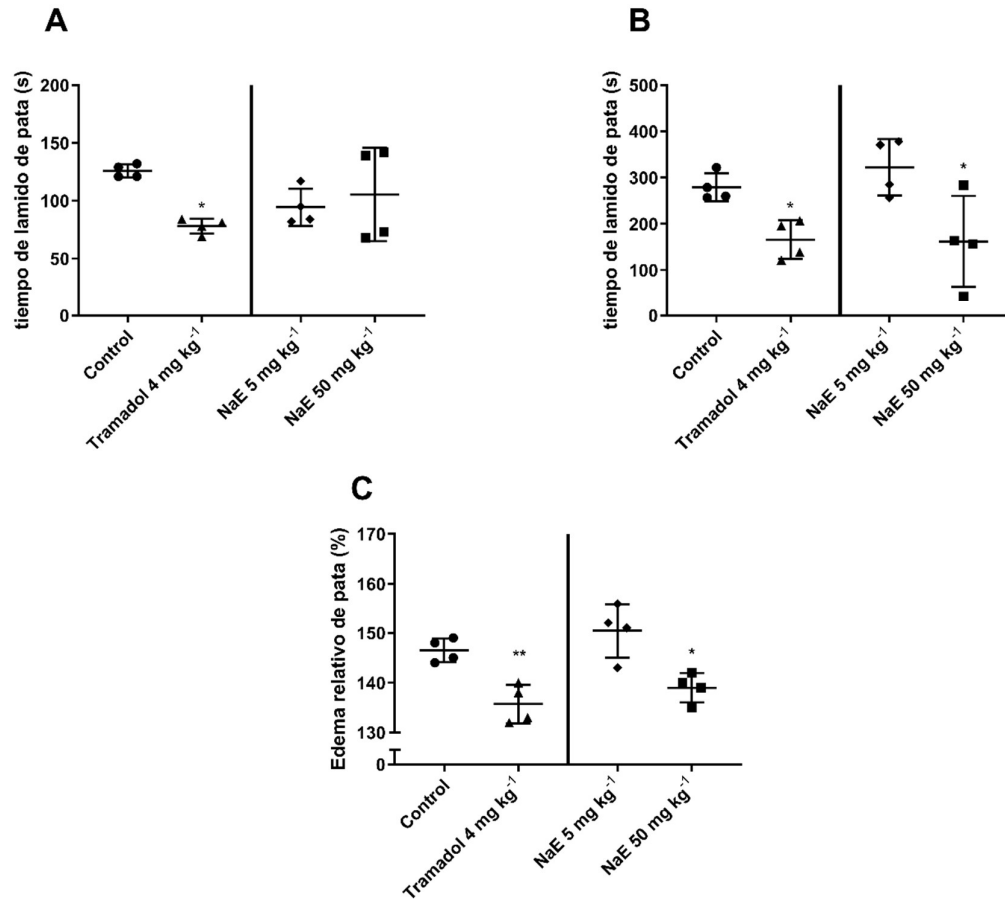


Figura 4.9. Efecto del tratamiento de NaE en el tiempo de lamido de pata (**A**, **B**) o en el edema relativo (**C**) en ratones tratados con formalina. La inflamación de la pata fue inducida por inyección intraplantar de 40 μ L de formalina al 2.5% en la pata trasera izquierda 1 h después de la inyección intraperitoneal de vehículo (grupo control), 5 mg kg⁻¹ NaE, 50 mg kg⁻¹ NaE o 4 mg kg⁻¹ de tramadol (control farmacológico). **A.** Respuesta de fase I (neurogénica) 0 – 5 min luego de la inyección con formalina. **B.** Respuesta de fase II (inflamatoria) 15 – 30 min luego de la inyección con formalina. **C.** Edema relativo de la pata 1 h después de la inyección con formalina. Los valores son presentados como medias $\pm$ desvío estándar de 4 ratones por grupo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA con corrección de comparaciones múltiples de Dunnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

En el modelo *in vivo* anterior se comprobó el efecto antiinflamatorio tras una administración sistémica de NaE. Así, teniendo en cuenta este resultado, posteriormente se decidió estudiar el efecto en un modelo de estimulación con LPS a nivel sistémico. En particular el órgano blanco estudiado para este modelo fue el cerebro debido a la asociación de la neuroinflamación con enfermedades neurodegenerativas (Shabab et al., 2017). Nuevamente las dosis utilizadas fueron de 50 mg kg⁻¹ y 5 mg kg⁻¹ de NaE. Luego del tratamiento con LPS (3 mg kg⁻¹ i.p.) se analizaron los ARNm de citoquinas proinflamatorias en el cerebro de los ratones y se comparó con un grupo control sólo con vehículo. Se adicionó un grupo tratado con dexametasona como control farmacológico de droga antiinflamatoria.

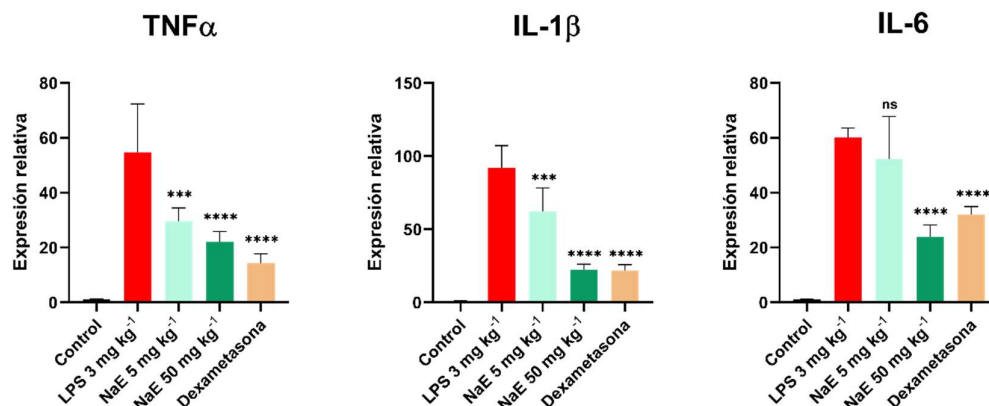


Figura 4.10. Efecto de NaE en la neuroinflamación producida por LPS en ratón. Se analizaron IL-1 β , IL-6 y TNF α en el tejido cerebral luego de 3 h de la inyección intraperitoneal de LPS 3 mg kg⁻¹. El análisis fue realizado por qPCR utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ normalizado con el grupo control y con GAPDH como gen normalizador. Los valores son expresados como medias $\pm$ desvío estándar con n=6. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA con corrección de comparaciones múltiples de Dunnet (ns: no significativo; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 comparado con el grupo LPS).

4.4. Efecto antiinflamatorio en línea de microglía murina

La reducción de la expresión de citoquinas a nivel de sistema nervioso central motivó el estudio de los efectos de NaE en una estirpe celular clave en este sistema, como lo son las células de microglía (Graeber et al., 2011). Entonces se propuso el estudio del efecto antiinflamatorio de NaE en la línea celular BV-2 (microglía murina).

Al modificar la línea de estudio se realizó nuevamente un ensayo de viabilidad, con el fin de estudiar si las concentraciones utilizadas previamente presentaban citotoxicidad para esta línea. Para el mismo se utilizó el kit de proliferación celular Cell Titer 96® (Promega, USA). El rango de concentraciones probadas está acotado a los resultados obtenidos previamente.

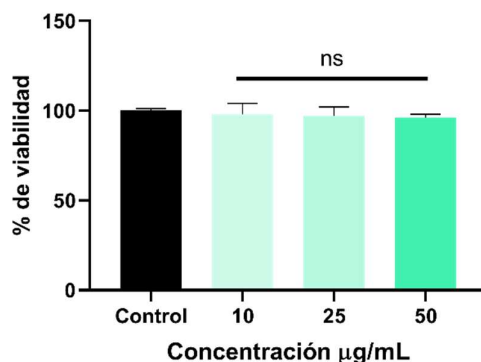


Figura 4.11. Viabilidad celular en línea celular BV-2 expuesta a NaE en diferentes concentraciones durante 24 h por el ensayo de MTS. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA con el test de múltiples comparaciones de Dunnet (ns: no significativo).

En el rango ensayado de concentraciones no se observaron modificaciones en la viabilidad celular por lo que se decidió emplear esas concentraciones en los posteriores ensayos. Al estimular las células con LPS se activa TLR4, como se ha mencionado previamente, y se estimula la producción de proteínas proinflamatorias. Una de las enzimas que se induce es la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2 o iNOS) la cual produce óxido nítrico que se termina convirtiendo en nitritos y nitratos en el sobrenadante de cultivo, las concentraciones de nitrito se pueden determinar con la reacción de Griess, por ello se determinaron sus niveles como medida de la respuesta de las células al LPS.

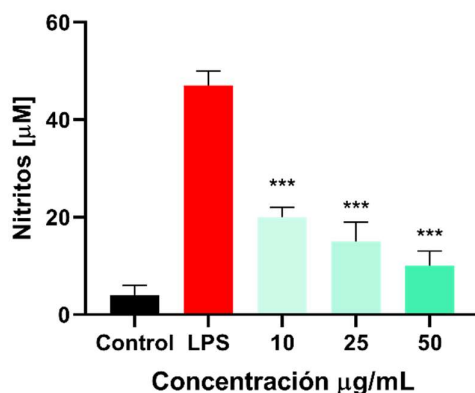


Figura 4.12. Producción de nitritos en línea celular BV-2 expuesta a NaE en diferentes concentraciones por 1 h y luego a LPS durante 24 h. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA con el test de múltiples comparaciones de Dunnet (***) $p < 0,001$.

La inhibición de la liberación de nitritos por parte de NaE al preincubarlo por 1h y luego tratar las células con LPS demuestra su actividad antiinflamatoria, sin embargo, una sola prueba sobre un mediador resulta insuficiente. Es por ello que se analizó en los sobrenadantes las cantidades liberadas de citoquinas proinflamatorias anteriormente estudiadas en forma de mensajero utilizando kits de ELISAs específicos para cada citoquina. Para ello se siguió el mismo esquema previo y se analizaron los sobrenadantes luego de 24 h de estímulo con LPS, los resultados obtenidos van en el mismo sentido que los obtenidos para la línea RAW 264.7 en cuanto a los mensajeros realizados por qPCR.

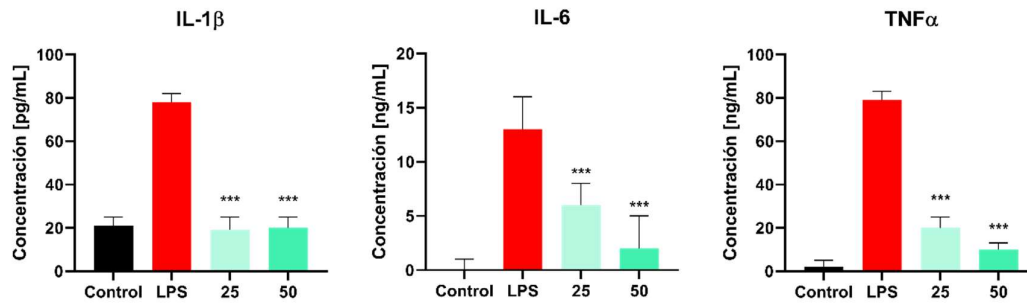


Figura 4.13. Producción de citoquinas proinflamatorias en línea celular BV-2 expuesta a NaE en diferentes concentraciones por 1 h y luego a LPS durante 24 h. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA con el test de múltiples comparaciones de Dunnet (***) $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

Citotoxicidad contra líneas tumorales humanas

Los extractos de *N. angustifolia* y *C. pareira* se probaron en un rango de dosis (10 – 200 µg/mL) durante 24 o 48 h y contra distintas líneas celulares tumorales humanas: A549 (cáncer pulmón), HT-29 (adenocarcinoma de colon), Caki-2 (carcinoma renal de células claras) y THP-1 (leucemia monocítica aguda); así como contra líneas celulares no tumorales HEK-293 (embrionaria renal) y L929 (fibroblasto murino). La actividad citotóxica de los extractos se comparó con las recomendaciones del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI), según las cuales un extracto entero posee una actividad citotóxica alta si ejerce su acción en concentraciones menores a 20 µg/mL; moderada entre 21 y 200 µg/mL; débil entre 201 y 500 µg/mL; no citotóxica en concentraciones mayores a 500 µg/mL (Nguyen et al., 2020). Estos valores corresponden a la posibilidad de encontrar un compuesto puro que en dosis muy bajas logre tener efecto sobre las células tumorales, es decir en concentraciones nanomolares. Estos ensayos responden a un cribado de la actividad citotóxica de los extractos y no a un estudio de efecto antitumoral. Esta diferencia en la terminología reviste importancia al reportar los datos, ya que una actividad *in vitro* se describe como citotóxica o antiproliferativa, mientras que en modelos *in vivo* recibe el nombre de antitumoral. Además, se reserva el adjetivo anticancerígeno solo para drogas con actividad probada en ensayos clínicos (Heinrich et al., 2018).

El ensayo de viabilidad empleado implica la reducción de una sal de tetrazolio, y no es capaz de discernir entre muerte celular y arresto del ciclo. Por ello los resultados se expresaron como concentración inhibitoria 50 y no como concentración citotóxica. Esto se debe a que la relación entre las absorbancias medidas a 490 nm y la viabilidad celular se da por la actividad mitocondrial de células vivas (Gilbert, 2017).

De los datos obtenidos se desprende que los extractos etanólicos de *N. angustifolia* y de *C. pareira* no presentan una actividad citotóxica alta contra las líneas tumorales humanas estudiadas. Esto no descarta completamente la presencia de un posible componente citotóxico que se encuentre en bajas cantidades, aunque sería poco probable, por los valores obtenidos. En cuanto a la actividad de NaE contra la línea THP-1, se trata de un efecto que se podría explorar en un futuro, pero no hay que descartar la posibilidad de que sea debido a las diferencias en el tipo de cultivo celular, ya que fue la única línea celular en suspensión probada mientras que tanto los controles como las otras líneas se desarrollan en monocapa. Los efectos de los flavonoides en la citotoxicidad de células tumorales se dan sobre diversos blancos, no solo dependiente del tipo de flavonoide, sino también del tipo celular involucrado (Liu et al., 2015). Estos blancos moleculares incluyen las vías PI3K, AKT, NF-κB, MAPK, Nrf2, así como la producción de metaloproteasas y otras enzimas involucradas en la remodelación del ambiente extracelular, afectando así la capacidad de metástasis (Hasnat et al., 2024). En cuanto a citas bibliográficas previas de los extractos como

agentes citotóxicos, se ha descrito para *Cissampelos pareira* el efecto de las raíces en las líneas de cáncer cervical SiHa y en la línea de carcinoma oral escamoso KB (Bala et al., 2015) y en particular de alcaloides aislados de las mismas versus la línea celular leucémica P-388 (Morita et al., 1993). Para *Nectandra* se ha descrito la actividad citotóxica de neolignanais aislados del extracto metanólico de hojas de *Nectandra megapotámica* contra la línea leucémica HL-60 (Ponci et al., 2015). Asimismo, neolignanais aislados, en este caso de *Nectandra leucantha*, también han demostrado citotoxicidad en líneas de melanoma humano (de Sousa et al., 2019).

Una de las posibles estrategias en el tratamiento del cáncer es la diferenciación celular (Bar-Hai & Ishay-Ronen, 2022; Zhu et al., 2023). En este sentido, diversos estudios han abordado la posibilidad de que los flavonoides la influencien, especialmente en leucemias, lo que podría explicar el efecto observado en la línea THP-1 en particular (leucemia monocítica aguda) (Kawaii et al., 1999; Liu et al., 2015; Ramanouskaya et al., 2009; Romanouskaya & Grinev, 2009; Rusak et al., 2005). Otra estrategia en el estudio del cáncer es la sensibilización o tratamiento sinérgico, en el cual se administra la droga de estudio en conjunto con fármacos comprobados, con el fin de disminuir la dosis utilizada o de mejorar los efectos antitumorales. Esta estrategia ha sido reportada para esta familia de compuestos (Moon et al., 2018; Zou et al., 2024). Así, diferentes aproximaciones al estudio de los efectos citotóxicos de estos productos naturales pueden ser exploradas en un futuro con los compuestos aislados y no con los extractos enteros.

Actividad antiinflamatoria

El primer modelo de estudio elegido fue de estimulación por LPS bacteriano en células de estirpe macrofágica, los eventos desencadenados por esta activación se encuentran descritos ampliamente en la literatura (Park & Lee, 2013). Se seleccionó una línea murina para trasladar posteriormente esos resultados a modelos *in vivo* de ratones; y macrófagos por ser células implicadas tanto en la respuesta primaria inflamatoria como en el proceso resolutivo (Wynn et al., 2013).

Cissampelos pareira

Como se ha mencionado previamente, los resultados del extracto etanólico de *C. pareira* no muestran una actividad antiinflamatoria en el modelo de estudio. No obstante, en contraste con nuestros hallazgos, una reciente revisión de las actividades farmacológicas de *C. pareira* menciona la actividad antiinflamatoria pero en modelos *in vivo* agudos, subcrónicos y crónicos utilizando extracto hidro etanólico de partes aéreas y suministrándolo por vía oral y a dosis elevadas como 400 mg/kg (Kumari et al., 2021). Esto podría deberse a diferencias edafoclimatológicas dado que es la primera vez que se evalúa esta actividad para la especie autóctona.

Nectandra angustifolia

La actividad antiinflamatoria de *Nectandra* también ha sido estudiada por otros autores. En un modelo de rata Wistar, se observó que la administración oral de extracto etanólico de *Nectandra falcifolia* redujo el volumen de exudado en la cavidad pleural causado por la inyección de carragenina (Oliveira De Melo et al., 2006; Truiti et al., 2006). Además, disminuyó el edema de pata causado también por este mismo compuesto, la actividad mieloperoxidasa en el exudado peritoneal y la concentración de nitritos y nitratos en plasma de las ratas wistar (Oliveira De Melo et al., 2006). Si bien los trabajos mencionan a extractos de hojas de *N. falcifolia*, esta denominación es un sinónimo de *N. angustifolia* por lo que se trata de la misma especie¹. Para determinar la concentración adecuada para los ensayos celulares, se realizaron diferentes medidas de viabilidad celular eligiéndose la mayor dosis de las probadas que no cause una alteración, con fines de maximizar las posibilidades de observar un efecto antiinflamatorio.

El modelo de estudio con preincubación de las células con el extracto, seguido del desafío con LPS es ampliamente utilizado en la literatura para la comprobación de efectos antiinflamatorios de extractos y compuestos naturales (H. Chen et al., 2016; W. F. Chen et al., 2022; Kacem et al., 2015; Kim et al., 2019; Soromou et al., 2012). El estímulo de TLR4 con LPS activa una cascada de señalización que culmina con la expresión de proteínas proinflamatorias, dentro de ellas las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF α . Estas citoquinas son clave en la respuesta inflamatoria ya que pueden actuar en otras células por sus receptores específicos aumentando la inflamación (Park & Lee, 2013). La pre incubación con NaE provoca una disminución de los niveles de ARNm de estas citoquinas en los diferentes tiempos estudiados, en consonancia con resultados similares publicados para compuestos naturales (Barakat et al., 2023; Coutinho-Wolino et al., 2022) y, en particular, para flavonoides (Leyva-López, Gutierrez-Grijalva, et al., 2016; Serafini et al., 2010).

Dentro de la cascada de señalización desencadenada por LPS, se encuentra el factor de transcripción nuclear NF- κ B, considerado un miembro clave de la respuesta generada. La activación provoca una translocación del citoplasma hacia el núcleo donde genera su acción (Pereira et al., 2022). Como se ha demostrado en los resultados la pre incubación con el extracto disminuye la translocación al núcleo, justificando así la disminución observada de producción de citoquinas proinflamatorias, estos resultados se encuentran en concordancia con otras publicaciones para compuestos naturales en la línea RAW 264.7 estimulada con LPS (C. C. Chen et al., 2016; Dunkhunthod et al., 2021; Wang et al., 2020).

Los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* justificaron estudios en modelos *in vivo*, el primero de ellos fue realizado por inyección de formalina en el dorso plantar de una pata trasera de

¹ WFO (2024): *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000379182>.

ratones. Este modelo se describe en la literatura con una respuesta nociceptiva bifásica (Mannan et al., 2017; Mohammad F. et al., 2017). La primera fase corresponde a una activación directa de los nociceptores, en la cual no se observaron diferencias entre los ratones tratados con NaE y los que no (control). Sin embargo en la segunda fase, que corresponde a una inflamatoria con liberación de histamina, serotonina, prostaglandinas y bradiquinina (Man et al., 2013), NaE en su mayor dosis causó una reducción en el tiempo de lamido de pata, resultados similares han sido publicados para otros extractos naturales (H. Chen et al., 2016; Mannan et al., 2017; Mohammad F. et al., 2017). A su vez, otro evento distintivo durante la inflamación es el edema, el cual en este experimento es causado por la inyección de formalina y como se muestra en resultados, la misma dosis de NaE que redujo la fase de dolor inflamatorio, fue capaz de reducir el volumen de edema. Como se ha comentado previamente, otros autores han demostrado el efecto antiinflamatorio *in vivo* de extractos de *N. angustifolia* utilizando otras vías de administración pero con resultados similares (Oliveira De Melo et al., 2006; Truiti et al., 2006).

El siguiente modelo *in vivo* utilizado fue por inyección sistémica de LPS. Aunque la inyección i.p. de LPS ha sido utilizada en distintos modelos agudos, subagudos o crónicos de inflamación, también se la utiliza para recrear enfermedades con componentes neuro inflamatorios como el Alzheimer o el Parkinson (Batista et al., 2019; Patil et al., 2019; Varatharaj and Galea, 2017). Como estas alteraciones representan un gran desafío de la medicina moderna, resulta enormemente interesante buscar alternativas terapéuticas, entre las cuales se han descrito los flavonoides (Bellavite, 2023; Leyva-López, Gutierrez-Grijalva, et al., 2016; R. Li et al., 2022; Taghizadieh et al., 2023). En este modelo, NaE fue capaz de disminuir los niveles de ARNm de citoquinas proinflamatorias en el cerebro de los ratones inyectados con LPS.

La respuesta neuro inflamatoria está caracterizada por una activación de las células de la microglía, las cuales son las primeras respondedoras a los insultos sufridos en el sistema nervioso central y desempeñan un rol clave tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Yang & Zhou, 2019). Cualquier reacción inflamatoria en el cerebro debe ser regulada para minimizar el daño a neuronas, que son altamente sensibles a estímulos inflamatorios como citoquinas (Graeber et al., 2011). A su vez, la respuesta de la microglía al LPS provoca una mayor producción de óxido nítrico lo que contribuye a la neurotoxicidad y disfunción celular en modelos neurona-glía (Batista et al., 2019). En las pruebas realizadas, se demostró que NaE ejerce un efecto inhibitorio frente a la neuro inflamación producida por LPS en células de microglía BV-2. Estos resultados son compatibles con otros reportados para extractos naturales sobre la misma línea celular (S. Y. Li et al., 2020; Rachsee et al., 2021) y también han sido descritos efectos similares para flavonoides aislados (W. F. Chen et al., 2022; Kim et al., 2019; R. Li et al., 2022; Z. Li et al., 2019; Ran et al., 2021; Taghizadieh et al., 2023).

Como han señalado otros autores, el estudio de la bioactividad del extracto entero es el primer paso en la investigación y otras pruebas son necesarias para elucidar el mecanismo de acción de cada componente (Leyva-López, Nair, et al., 2016; Nair et al., 2015). Los hallazgos descritos precedentemente, si bien son alentadores constituyen el puntapié inicial para ulteriores experimentos enfocados en el fraccionamiento. Es esencial comprobar que los componentes puros puedan potenciar el efecto biológico del extracto entero y descartar la posibilidad de que el efecto observado se deba a un mecanismo concertado de acción (Heinrich et al., 2018). Así en el **capítulo V**, se presenta una serie de experimentos con las fracciones obtenidas a partir de los extractos enteros tendientes a evaluar sus propiedades biológicas.

CAPÍTULO V

Caracterización de la bioactividad de fracciones

RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

Capítulo V

Caracterización de la bioactividad de fracciones

RESULTADOS	87
5.1. Actividad antiinflamatoria en RAW 264.7.....	87
5.1.1. <i>Cribado con Griess de las fracciones</i>	87
5.1.2. <i>Comprobación de la viabilidad celular</i>	88
5.1.3. <i>Expresión de óxido nítrico sintasa inducible</i>	88
5.1.4. <i>Estudio estructural por espectrometría de masas del compuesto mayoritario</i>	89
5.2. Análisis actividad antiinflamatoria en BV-2.....	91
5.2.1. <i>Cribado con Griess de las fracciones</i>	91
5.2.2. <i>Expresión de proteínas relacionadas con la inflamación</i>	92
5.2.3. <i>Vías de señalización inflamatorias</i>	93
5.2.4. <i>Estudio antioxidante a nivel celular</i>	96
5.2.5. <i>Detección de flavonoides a nivel celular</i>	98
5.3. Picos colectados por HPLC preparativo	99
DISCUSIÓN	101

RESULTADOS

En este último capítulo de resultados y discusión se continuará con la caracterización de la bioactividad de los extractos poniendo énfasis en las fracciones obtenidas por cromatografía flash, tal como se describe en el **capítulo III**.

Una vez descartada la actividad citotóxica sobre líneas tumorales y confirmada la actividad antiinflamatoria del extracto entero, surge la necesidad de verificar dicha actividad en diversas fracciones, por lo que es esencial realizar un cribado de estas.

5.1. Actividad antiinflamatoria en RAW 264.7

5.1.1. Cribado con Griess de las fracciones

Como cribado de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas por cromatografía flash, se utilizó la medición de la concentración de nitritos en el sobrenadante de células pretratadas con fracciones y posteriormente desafiadas con LPS. Se decidió utilizar una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ para comparar el efecto observado a una única concentración en comparación con los extractos enteros. En la **Figura 5.1** se observan los resultados para el fraccionamiento de *Nectandra angustifolia* (A) y para el de *Cissampelos pareira* (B). Además, siguiendo el mismo esquema se incluyeron controles de distintas concentraciones de DMSO (solvente utilizado para disolver los extractos), de quercetina y rutina y de un inhibidor conocido de iNOS, L-NAME (L-nitro arginina metil ester) (C). Como se describió en el **capítulo IV**, el LPS es capaz de estimular la expresión de la enzima iNOS que produce grandes cantidades de óxido nítrico y este se detecta como nitritos en el sobrenadante de cultivo.

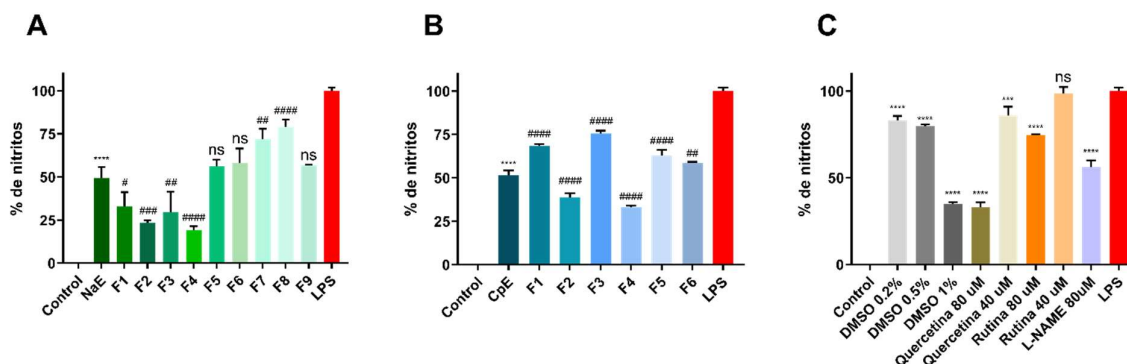


Figura 5.1. Determinación del contenido de nitritos en sobrenadante de células RAW 264.7 preincubadas con los extractos o fracciones de *Nectandra angustifolia* (A), *Cissampelos pareira* (B), controles de solventes o flavonoides puros (C) por 1 h y luego estimuladas con LPS por 24 h. Resultados expresados como media $\pm$ desvío estándar y como porcentaje respecto al LPS. Análisis estadístico por ANOVA corregido por Dunnet comparado con el grupo LPS (*) o respecto al extracto entero (#) (ns: no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$).

5.1.2. Comprobación de la viabilidad celular

Dentro de las posibles causas de una disminución en el valor de concentración de nitritos en el medio comparado con el LPS, se encuentra la muerte celular, ya que sin células viables que expresen iNOS no habrá producción de óxido nítrico y consecuentemente nitritos liberados al medio. Por lo tanto, para corroborar los resultados obtenidos se realizó un ensayo de viabilidad celular con las dosis expuestas de fracciones (50 $\mu\text{g/mL}$) y con una dosis menor (25 $\mu\text{g/mL}$) para las fracciones con mejor resultado, la F4 tanto de *C. pareira* como de *N. angustifolia*, teniendo en cuenta que en la **Figura 4.5** ya se demostró el efecto citotóxico de *C. pareira* en la concentración mayor. Es interesante destacar que la concentración de DMSO utilizada en las pruebas es $\leq$ a 0,2% por lo que su efecto en la producción de nitritos es menor. En la **Figura 5.2** se observa la disminución significativa en la viabilidad celular producida por la F4 de CpE.

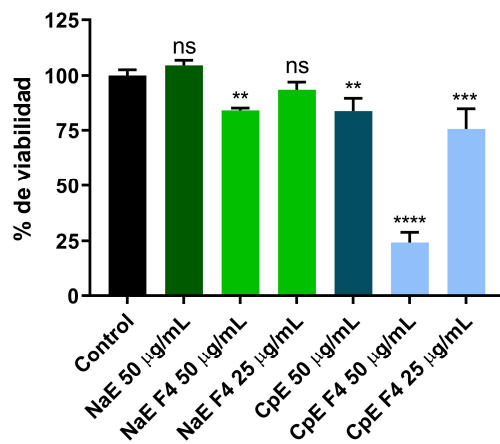


Figura 5.2. Determinación de viabilidad celular en células RAW 264.7 expuestas a los extractos o fracciones por 24 h. Resultados expresados como media $\pm$ desvío estándar. Análisis estadístico por ANOVA (ns: no significativo; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$).

5.1.3. Expresión de óxido nítrico sintasa inducible

Los resultados de toxicidad de CpE en 50 $\mu\text{g/mL}$ son concordantes con los previamente mostrados para la misma línea celular, en contraste con NaE, que no muestra rastros de citotoxicidad en la máxima concentración utilizada. Si bien F4 de NaE muestra una disminución en la viabilidad a 50 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 5.2**), no explicaría la disminución de nitritos observada por lo que se decidió medir el mensajero que codifica la proteína con el fin de determinar la expresión de iNOS en las células estimuladas.

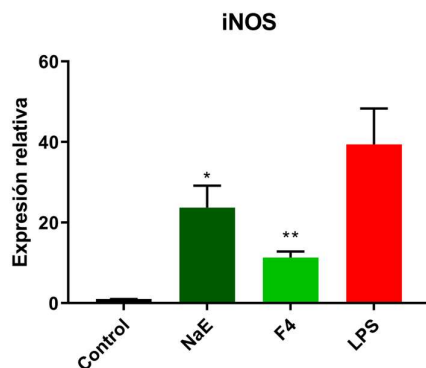


Figura 5.3. Determinación de la expresión de iNOS en células RAW 264.7 expuestas a NaE o F4 (50 µg/mL) por 1 h previa a la estimulación con LPS 1 µg/mL por 24 h. Resultados expresados como media ± desvío estándar. Análisis estadístico por ANOVA (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

5.1.4. Estudio estructural por espectrometría de masas del compuesto mayoritario

El estudio de los extractos por cromatografía acoplada a espectrometría de masas representa una primera aproximación a los resultados estructurales definitivos. Con la reciente puesta en marcha en la UNNE de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Sciex QqQ 4500), se pudo concretar un análisis preliminar de la fracción F4 obtenida, ya que la misma presenta actividad y un solo pico en el detector DAD del HPLC-analítico. En la **Figura 5.4** se muestra el espectro HPLC-DAD de dicho pico, mostrado previamente en el **capítulo III**, mientras que en la **Figura 5.5** se observan los espectros de masas obtenidos por infusión directa en el espectrómetro triple cuadrupolo en modo negativo.

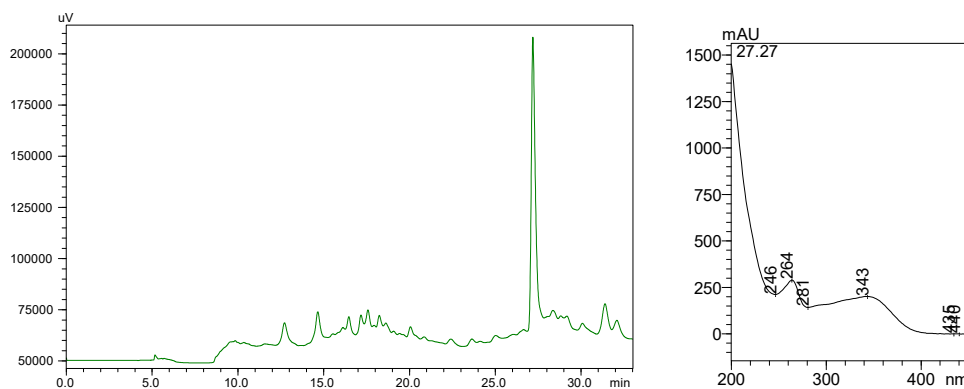


Figura 5.4 Cromatograma a 280 nm de la fracción F4 y espectro 200 a 450 nm del pico mayoritario, se observan $\lambda_{\text{máx}}$ en 264 y 343 nm.

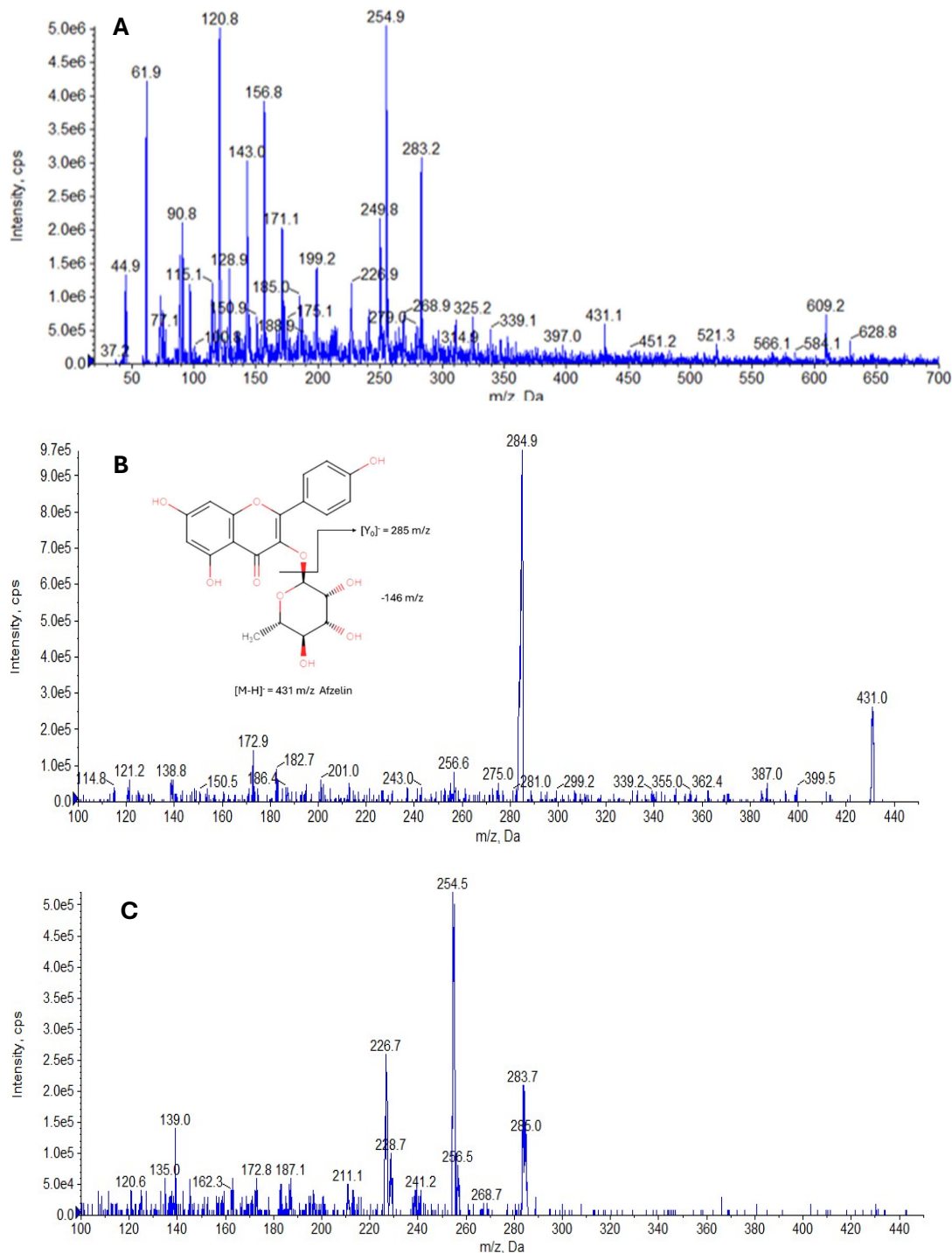


Figura 5.5. A. Corriente total de iones en Q1 negativo para relaciones masa carga entre 20 y 700. **B.** Q3 del pico 431 con energía de colisión de 30 eV y estructura propuesta. **C.** Q3 del pico 431 con energía de colisión de 50 eV.

En la **Figura 5.5 A** en Q1 se observan diversos picos, resultan de interés los de masa/carga 431.1 y 609.2 ya que podrían corresponderse con la pérdida de un protón de compuestos de 432 y 610 de masa respectivamente y estas relaciones de masa carga son compatibles con un derivado

desoxihexosa de kaempferol (286 + 164 - 18) y con un disacárido de quercetina (302 + 326 - 18). Las transiciones observadas en Q3 para 30 eV (**Figura 5.5 B**) y 50 eV para el compuesto de masa 431 son 431.1 → 285 y 255 mayoritariamente. Para el compuesto de 609 *m/z* se observó una transición a 300 *m/z* compatible con compuestos descriptos previamente por la Dra. Torres.

5.2. Análisis actividad antiinflamatoria en BV-2

5.2.1. Cribado con Griess de las fracciones

El análisis cromatográfico de esta F4 obtenida se presentó en la **Figura 3.5**. Los resultados obtenidos con dicha fracción impulsaron la consecuente obtención en bache, en sucesivas cromatografías flash para obtener mayor cantidad de material. Se juntaron los extractos obtenidos de sucesivas corridas y al analizar el perfil cromatográfico de las nuevas fracciones, no se logró replicar el mismo perfil que en la primera vez, aunque se obtuvo uno similar, tal como se muestra en las **Figuras 3.6 y 3.7**.

Este cambio llevó a una nueva verificación de la actividad de estas fracciones, pero dados los experimentos de neuroinflamación presentados en el capítulo precedente, se ensayó sobre la línea celular BV-2, correspondiente a microglía murina. Las fracciones elegidas fueron las que presentaban flavonoides y cercanas a la anterior F4, es decir en el fraccionamiento en bache F5, por lo cual se estudiaron F4 y F6, además de la última fracción en eluir ya que presenta menor proporción de compuestos en el cromatograma a 280 nm (**Figura 3.7**). A su vez, se utilizó el extracto de *C. pareira* con el fin de evaluar en un nuevo modelo su actividad antiinflamatoria. Nuevamente las células fueron preincubadas con los extractos por 1 h y posteriormente desafiadas con LPS; luego se analizó en el sobrenadante la presencia de nitritos con el reactivo de Griess.

Las fracciones F5 y F6 muestran un resultado comparable a NaE en la mayor concentración y un resultado mejor que el extracto entero en la concentración de 25 µg/mL. En cuanto a CpE se observa que en ambas concentraciones tiene un efecto menor al de NaE.

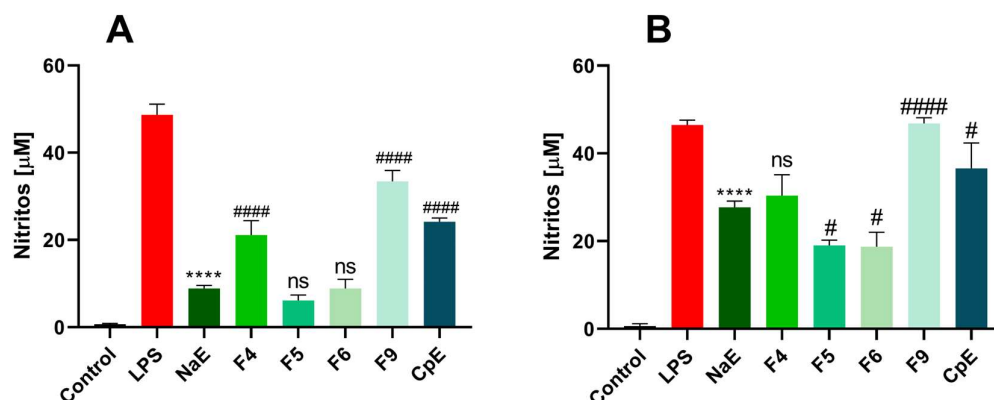


Figura 5.6. Producción de nitritos en células BV-2 pretratadas con extractos en concentración de 50 µg/mL (**A**) o 25 µg/mL (**B**) por 1 h y posteriormente desafiadas con LPS por 24 h. Resultados expresados como media ± desvío estándar. Análisis estadístico por ANOVA, * indica comparación con el grupo LPS y # con NaE (ns: no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,0001$).

5.2.2. Expresión de proteínas relacionadas con la inflamación

Para corroborar el efecto observado, se midió la expresión de la proteína iNOS involucrada en la generación de óxido nítrico. El ensayo se realizó por WB utilizando dos concentraciones de extractos. Simultáneamente, se midió la expresión de otra proteína inducible por LPS, la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

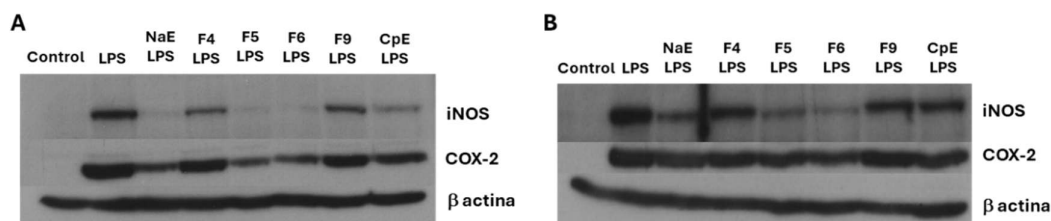


Figura 5.7. Expresión de iNOS y COX-2 en células BV-2. Células sin tratamiento (control), tratadas con LPS por 24 h o pretratadas por 1h con el extracto indicado en 50 µg/mL (**A**) o 25 µg/mL (**B**) y luego 24 h con LPS. Se incluye β actina como proteína normalizadora de la carga. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

La inhibición de la expresión de iNOS corrobora el efecto observado en las pruebas de Griess para nitritos y se verifica que el NaE presenta una mayor acción comparado con el CpE y las fracciones que resultan con mayor actividad son la F5 y F6 tanto en la inhibición de la expresión de iNOS y como en la de ciclooxigenasa 2 (COX-2) estimuladas por LPS.

La producción de citoquinas proinflamatorias también es estimulada por LPS, tal como se ha comprobado por la cuantificación de ARNm en capítulos anteriores. En este caso se cuantificaron las concentraciones de citoquinas liberadas al medio de cultivo por ELISA.

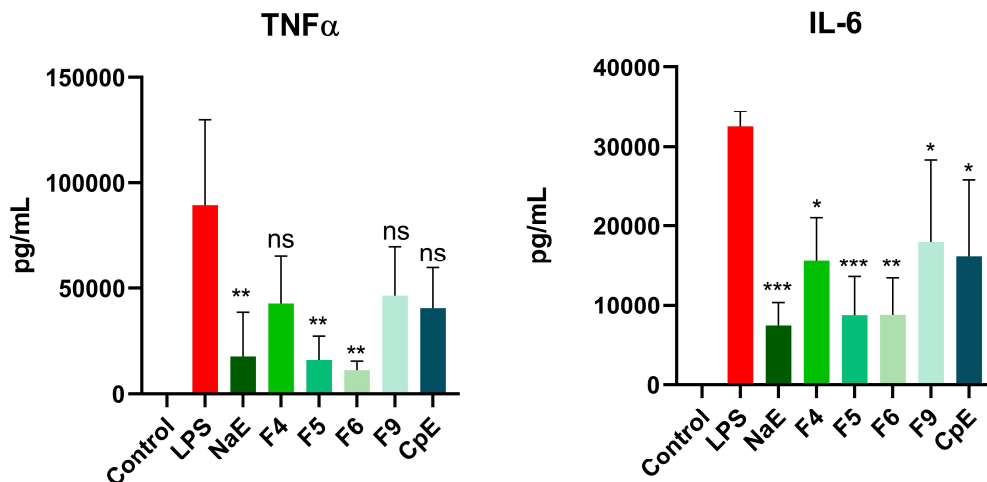


Figura 5.8. Liberación de citoquinas en células BV-2 sin tratamiento (control), tratadas con LPS por 24 h o pretratadas por 1h con el extracto indicado en 50 µg/mL y luego 24 h con LPS. Los sobrenadantes fueron analizados mediante ELISA. Los resultados mostrados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó en comparación con el grupo de LPS por ANOVA (ns: no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

El estímulo con LPS conlleva la activación de TLR4 que termina desencadenando la producción de citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e IL-6, tal como se puede observar en la **Figura 5.8**. La preincubación con las diferentes fracciones o extractos produce una disminución en los niveles de citoquinas observados, siendo el extracto de NaE y sus fracciones F5 y F6 las que poseen una mejor respuesta. Estas fracciones se decidieron estudiar en una concentración menor también (25 $\mu\text{g/mL}$) y sus resultados se muestran en la **Figura 5.9**. En la concentración más baja, logran un mejor efecto que NaE, este resultado y el anterior son coincidentes con los obtenidos para la expresión de proteínas iNOS y COX-2 y para la producción de nitritos.

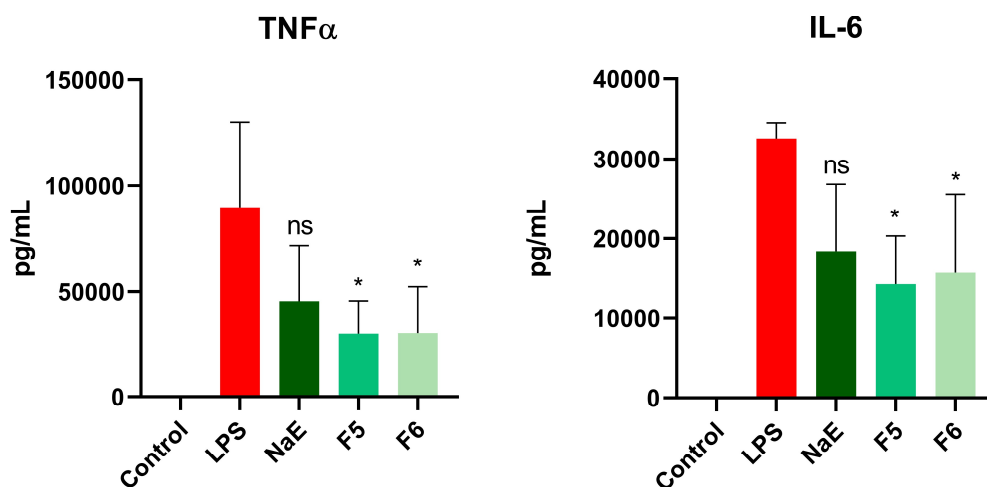


Figura 5.9. Liberación de citoquinas en células BV-2 sin tratamiento (control), tratadas con LPS por 24 h o pretratadas por 1h con el extracto indicado en 25 $\mu\text{g/mL}$ y luego 24 h con LPS. Los sobrenadantes fueron analizados mediante ELISA. Los resultados mostrados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó en comparación con el grupo de LPS por ANOVA (ns: no significativo; *, $p < 0,05$).

En este modelo estudiado, NaE también presenta marcada actividad antiinflamatoria. Por su parte, CpE presenta una leve reducción de los mediadores inflamatorios estudiados. Estos resultados justifican una profundización en la actividad antiinflamatoria de *Nectandra angustifolia* únicamente, poniendo el foco en la fracción F5 que presenta una actividad ligeramente mayor. La F6 presenta una composición similar a la de la F5, según lo observado por cromatografía (**Figura 3.7**), lo que la convierte en una candidata viable para pruebas posteriores. Sin embargo, para no duplicar resultados se optó por una de las fracciones.

5.2.3. Vías de señalización inflamatorias

Una vez decidida la fracción de estudio, se procedió al estudio de la vía de señalización inducida por LPS-TLR4. Al igual que lo realizado para extracto entero en el capítulo anterior, en primera instancia se estudió la translocación de NF- κ B p65 al núcleo luego de la activación con LPS.

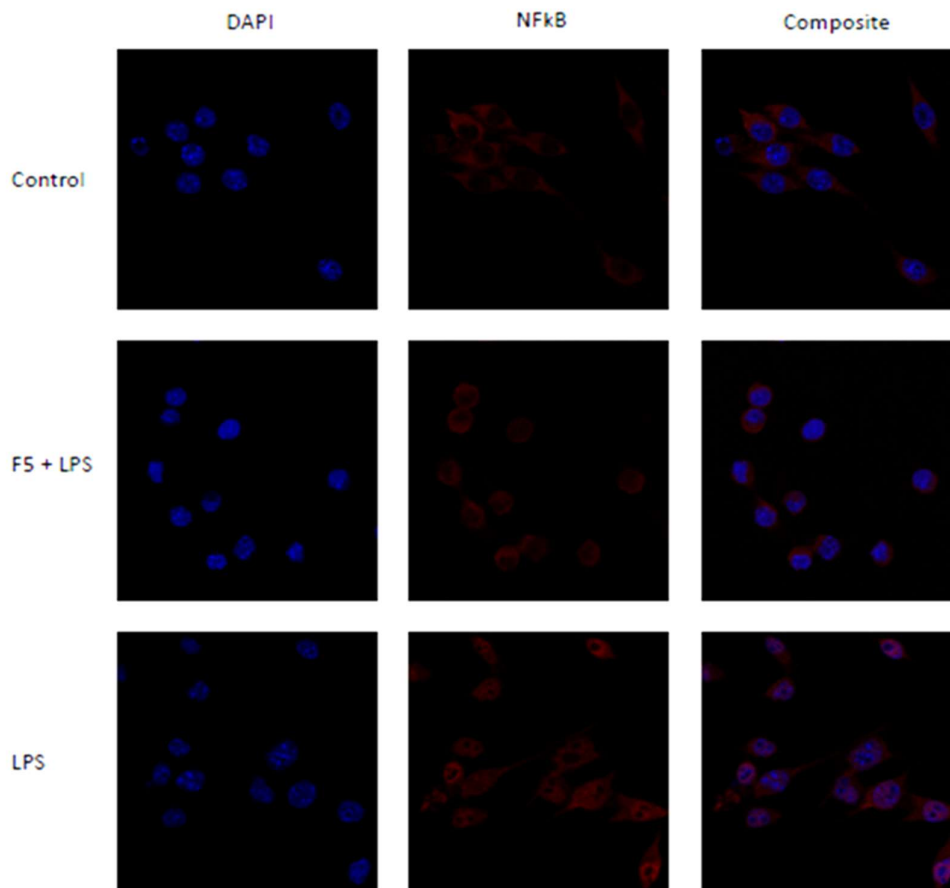


Figura 5.10. Translocación de NF- κ B p65 (rojo) al núcleo en células BV-2 sin tratar (control), tratadas con LPS por 1 h (LPS) o pretratadas con F5 50 μ g/mL por 1 h previo a la estimulación con LPS por 1 h (F5+LPS). La colocalización nuclear fue comprobada por tinción con DAPI (azul). Imágenes representativas de 3 experimentos. Adquisición con objetivo de 63x.

Al igual que para el extracto entero (**Figura 4.8**), la fracción activa del mismo es capaz de disminuir la translocación de NF- κ B. Antes de esta translocación al núcleo de la subunidad p65, la misma se fosforila; a su vez en una instancia aún anterior se realiza la fosforilación de sus inhibidores ($\text{I}\kappa\text{B}$). Con el fin de estudiar estos eventos, se realizó western blot de la fosforilación de la subunidad p65 y de la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{Ba}$ (**Figura 5.11**).

Otra de las vías implicadas en el efecto transcripcional inducido por LPS vía TLR4, involucra la activación de la cascada de las MAPK (p38, p-JUN, pERK). Esta vía concluye en la fosforilación del factor de transcripción AP-1 y su translocación al núcleo para ejercer la acción. El factor de transcripción AP-1 se compone de c-FOS y c-JUN, en este caso se estudió la fosforilación de c-JUN como exponente de la vía.

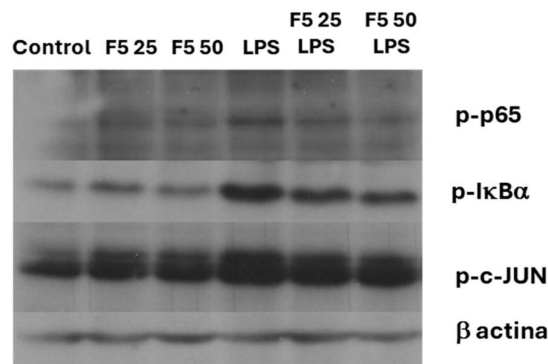


Figura 5.11. Expresión de proteínas fosforiladas en células BV-2 tratadas con diferentes concentraciones de F5 (50 o 25 $\mu\text{g/mL}$) por 1 h y luego con LPS por 1 h más. La proteína p65 es una subunidad de NF- κB y la proteína I $\kappa\text{B}\alpha$ un inhibidor del mismo. En ambos casos, su fosforilación implica la traducción de un estímulo proinflamatorio. Se incluye β -actina como proteína normalizadora de la carga. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Como se puede observar en la figura, la preincubación de las células con la fracción 5 de NaE reduce la fosforilación, y por ende la activación de las vías estudiadas. Esta evidencia experimental sugiere que el blanco molecular de la fracción se encontraría cascada arriba de ambas señales.

Entre los posibles receptores celulares involucrados en la actividad de compuestos naturales se encuentran el receptor de laminina 67 (LR-67) y el receptor de ácidos biliares (TGR5), los cuales se postularon como posibles blancos de acción de F5. Para comprobar esta hipótesis, se utilizaron inhibidores farmacológicos, NSC-47924 para LR-67 o SBI-115 para TGR5 y un anticuerpo neutralizante para LR-67 administrándolos 1h previo a la estimulación con F5. En la **Figura 5.12** se puede observar que estas preincubaciones no evitaron el efecto antiinflamatorio de F5, por lo que otro mecanismo de acción debe estar involucrado. Se incluyen controles del tratamiento de cada uno de los inhibidores utilizados en conjunto con el LPS para verificar su efecto en el ensayo.

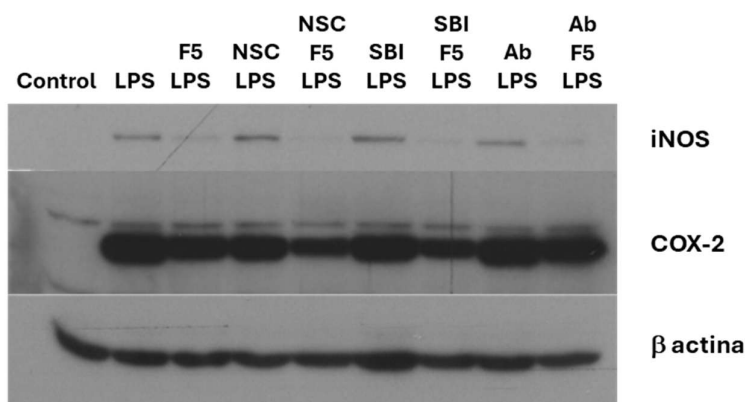


Figura 5.12. Expresión de proteínas iNOS y COX-2 en células BV-2 tras 24 h de tratamiento con LPS. Pretratamientos al desafío con LPS fueron realizados con F5 (50 $\mu\text{g/mL}$) y/o NSC-47924 20 μM , SBI-115 10 μM , anticuerpo anti LR-67 (Ab) por 1 h. Se incluye β -actina como proteína normalizadora de la carga. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

5.2.4. Estudio antioxidante a nivel celular

Las situaciones de isquemia-reperfusión en los tejidos, como las producidas ante un accidente cerebro vascular isquémico, generan hipoxia celular en un contexto inflamatorio con estrés oxidativo. Un modelo preliminar *in vitro* para abordar el estudio de este fenómeno consiste en estimular las células con cloruro de cobalto (CoCl_2), el cual genera hipoxia química por estabilización de HIF-1 α y especies reactivas del oxígeno (ROS). Los compuestos polifenólicos dentro de los cuales se encuentran los flavonoides, tienen actividad antioxidante lo cual explicaría la actividad de NaE y sus fracciones tal como se ha demostrado en el **capítulo III**. Sin embargo la traducción de ese efecto *in vitro* con un radical estable como lo es el DPPH a un efecto biológico debe ser comprobada. Con el fin de determinar el efecto antioxidante de F5 y si el mismo se debía a un estímulo de las defensas antioxidantes celulares o a un efecto captador directo de radicales y especies reactivas, se diseñó un modelo experimental acorde (**Figura 5.11**). De tal manera las células fueron dejadas en medio de cultivo (A) o pre tratadas con F5 (B) por 24 h, luego cargadas con la sonda DCFH-DA por 30 min y posteriormente estimuladas por 4 h con CoCl_2 (1), con CoCl_2 y F5 (2), con F5 (3) o dejadas con medio de cultivo (4), finalmente se lee la fluorescencia en un lector de microplacas. Entonces si separamos las células que tengan un tratamiento con CoCl_2 se tiene una respuesta máxima (A1), el efecto de la coincubación (A2), el efecto de la preincubación (B1) y el efecto combinado (B2) para los tratamientos de 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado se tienen las células sin CoCl_2 , que representarían el estrés oxidativo basal de las células (A4) y como este se encuentra afectado por una incubación con F5 previa a la sonda (B4), posterior (A3) y el efecto conjunto de ambas (B3).

Analizando los resultados obtenidos se puede observar un efecto en la disminución de los niveles de ROS basales al tratar las células con el extracto posterior a la sonda tanto para 25 como 50 $\mu\text{g/mL}$, sin una diferencia notoria de efecto acorde a la concentración de F5. La producción de ROS se ve incrementada por el efecto de CoCl_2 como se puede apreciar en la diferencia de valores comparados con el gráfico del estado basal, y este efecto se ve contrarrestado por F5 en proporción a su concentración. En ambos estados el efecto mayoritario de F5 se da al incubarlo posterior a la sonda ya que si comparamos con el efecto de una incubación en las dos etapas no hay diferencias significativas. Estos resultados podrían ser compatibles con una actividad captadora de radicales más que por un estímulo de las defensas antioxidantes de la célula, y la disminución observada en el tratamiento B1 de mayor dosis podría deberse a compuestos remanentes del extracto dentro de las células.

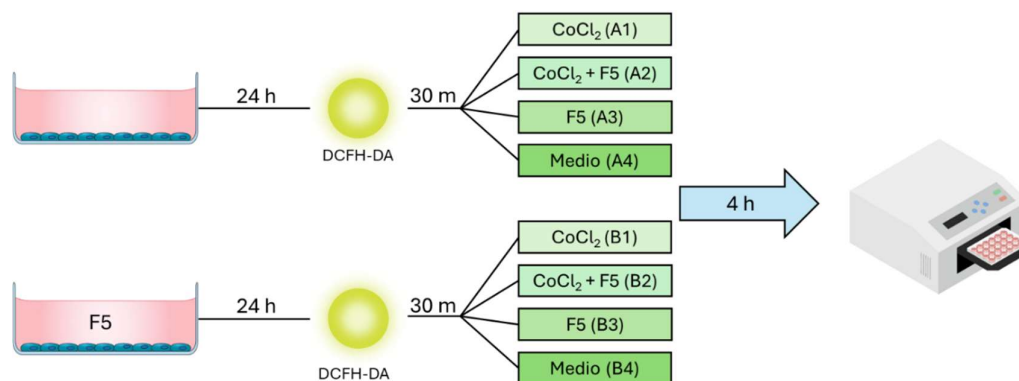


Figura 5.13. Esquema experimental utilizado en la determinación de la actividad antioxidante en células BV-2 tratadas con F5 en 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$ por acción de CoCl_2 300 μM .

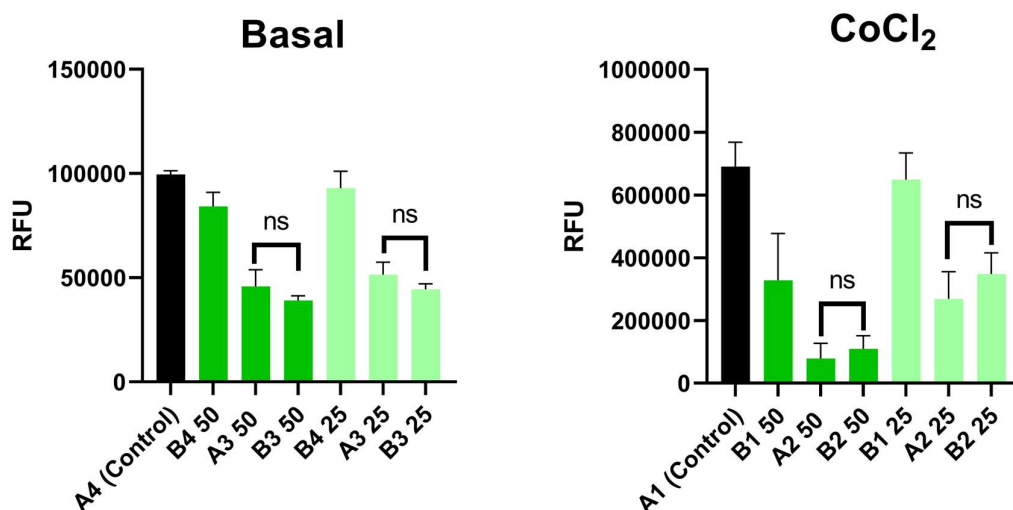


Figura 5.14. Cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) medidas por reacción con sonda fluorescente DCFH-DA en células BV-2 tratadas con fracción 5 del extracto de acuerdo con el esquema de tratamientos mencionados en la **Figura 5.13**.

El CoCl_2 produce hipoxia química por estabilización de HIF-1 α por lo que se decidió estudiar sus niveles por western-blot a fin de corroborar el efecto de F5 sobre la misma. A su vez, una de las proteínas involucradas en la respuesta celular al estrés oxidativo es HO-1, por lo que en el mismo modelo se decidió evaluar su expresión.

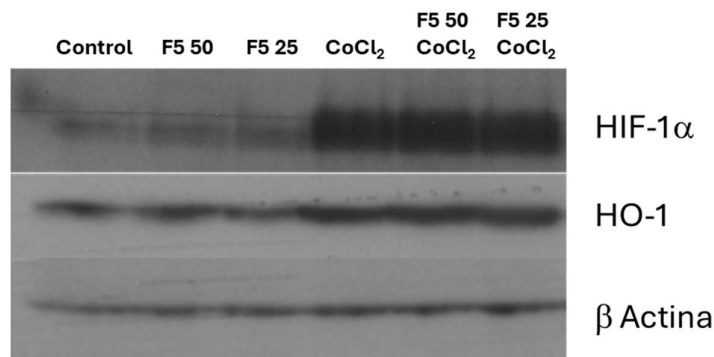


Figura 5.15. Expresión de proteínas en células BV-2 tratadas con diferentes concentraciones de F5 (50 o 25 $\mu\text{g/mL}$) y con CoCl_2 300 μM por 4h. Se incluye β actina como proteína normalizadora de la carga. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

El tratamiento de las células con F5 solamente no produjo cambios en ninguna de las proteínas estudiadas, es decir no produce la estabilización del HIF-1 α ni activa la vía de respuesta antioxidante HO-1. Tampoco disminuyen o bloquean las señalizaciones inducidas por el CoCl_2 .

5.2.5. Detección de flavonoides a nivel celular

En el **capítulo III** se ha mencionado el uso del ácido difenil borónico 2 aminoetiléster o DPBA para la detección de flavonoides en cromatografía de placa delgada, sin embargo, algunos autores han empleado este mismo compuesto para detectar la presencia de flavonoides en las células por medio de microscopía de fluorescencia y de citometría de flujo. Esto motivó aplicar la metodología en la línea BV-2 tratadas con F5 con el fin de poder determinar su localización celular (**Figura 5.16 A**) y cuantificarla en dos tiempos distintos (**Figura 5.16 B**).

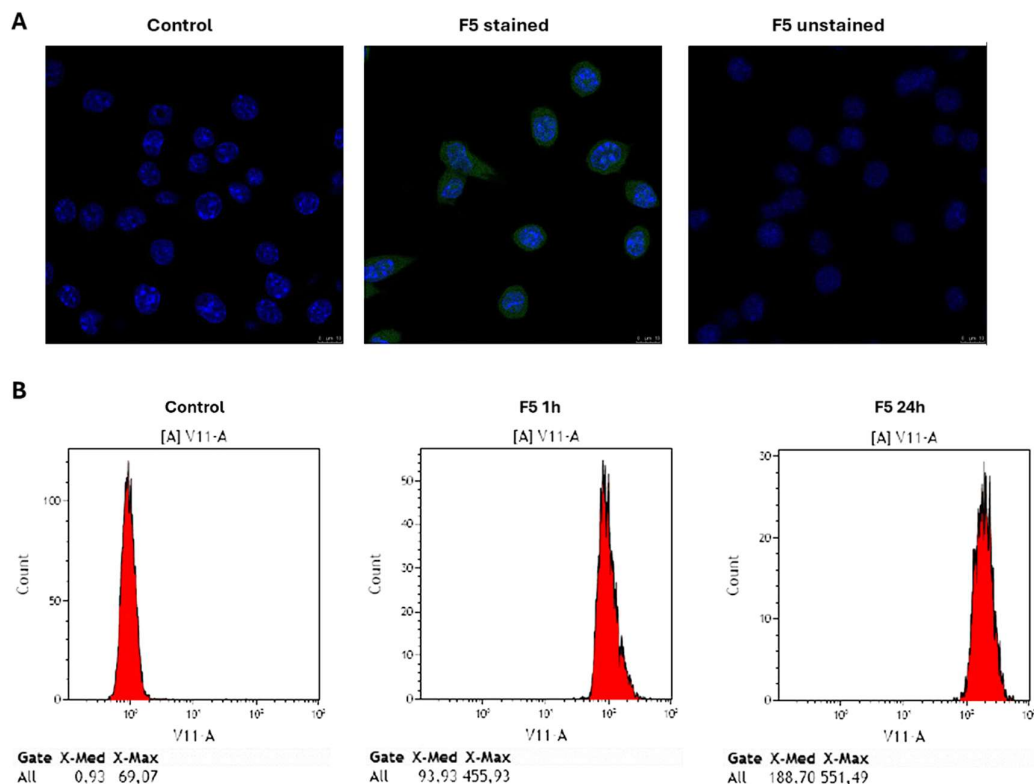


Figura 5.16. Internalización de flavonoides por DPBA en células BV-2 tratadas con F5. **A.** Visualización por microscopía confocal con objetivo 63x de células sin tratar teñidas con DAPI (píxeles azules), células tratadas con F5 por 1 h y teñidas con DAPI y DPBA (píxeles verdes) y de células tratadas con F5 por 1 h y teñidas con DAPI. **B.** Citometría de flujo de células sin tratar (control), tratadas con F5 por 1 h o por 24 h y luego teñidas con DPBA. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos indicarían la presencia de los compuestos dentro de las células, tanto del núcleo como del citoplasma, en la primera hora de tratamiento, es decir compatible con los pretratamientos realizados en los esquemas experimentales a lo largo de la tesis y esta fluorescencia aumenta a las 24 h de tratamiento con respecto a la primera hora como puede observarse por la fluorescencia media de la **Figura 5.16 B.**

5.3. Picos colectados por HPLC preparativo

En el **capítulo III** se expuso la obtención de fracciones colectadas directamente mediante HPLC preparativo, de esta forma se logró separar cada uno de los picos mayoritarios observados en el detector obteniéndose 8 de ellos compatibles con flavonoides.

Si bien las pruebas previas delimitan la actividad en la F4/F5, la aparición de nuevos picos y por ende posibles compuestos, conllevó a la aplicación de un cribado de los 8 posibles compuestos bioactivos. Nuevamente la prueba seleccionada fue la inhibición de la producción de óxido nítrico y consecuente liberación al medio.

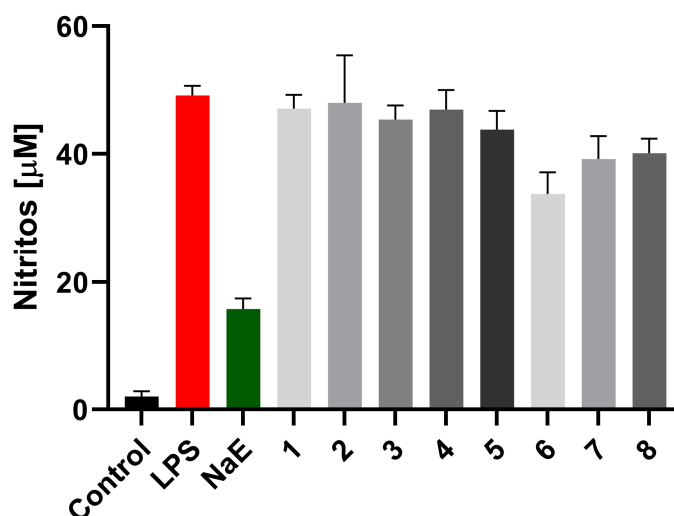


Figura 5.17. Producción de nitritos en células BV-2 pretratadas con NaE o los picos indicados (50 µg/mL) por 1 h y posteriormente desafiadas con LPS. Resultados presentados como medias $\pm$ desvío estándar.

Como puede observarse en la **Figura 5.17** ninguno de los picos presenta actividad comparable con el extracto entero a iguales concentraciones (50 µg/mL). Esta evidencia sugiere que la actividad biológica antes observada es consecuencia de un efecto concertado entre varios compuestos presentes en las fracciones ensayadas. No obstante, no es descartable la hipótesis de diferencias en la concentración debido a la presencia de sales formadas por el buffer acuoso utilizado, o una posible inactivación o pérdida de función de estos compuestos debido al método de separación empleado.

DISCUSIÓN

En este capítulo se presenta el desafío de ensayar la bioactividad de diversas fracciones en simultáneo, para ello se buscó una reacción sensible y que a su vez tenga un costo relativamente accesible para la cantidad de muestras analizadas. Estas cualidades son características del ensayo de Griess, que se basa en una diazotación en medio ácido. En este proceso, el NO_2^- presente en la muestra reacciona con sulfanilamida produciendo el agente diazotante que luego copula con la N-(1-naftil)-etilenodiamina para dar un producto coloreado que se mide a 540 nm (Sadeer et al., 2020). Los nitritos que se determinan en el medio de cultivo provienen de la oxidación del óxido nítrico producido en las células a través de la óxido nítrico sintasa (NOS), particularmente de la NOS2 que es inducible por la estimulación con LPS vía TLR4; por lo cual también recibe el nombre de iNOS (Hirohashi et al., 1999). Los altos niveles de expresión de la iNOS provocadas por LPS, hacen posible la detección de los nitritos en el sobrenadante celular. Se puede incrementar la sensibilidad del ensayo al adicionar la enzima nitrato reductasa, sin embargo, esta adición incrementa en gran medida el costo del ensayo. En las condiciones de trabajo establecidas, la sensibilidad alcanzada permite diferenciar claramente el estímulo con LPS de las células sin estimular (control). El uso de esta prueba en particular como cribado de la actividad antiinflamatoria de extractos naturales ha sido estudiado por otros autores (Dirsch et al., 1998). Resulta interesante la inhibición descrita por Dirsch y colaboradores del solvente DMSO en concentraciones superiores al 0,2%, ya que se ha corroborado el mismo resultado y la inhibición causada por la clorofila en extractos de hojas. Los extractos de *N. angustifolia* y de *C. pareira* presentan en su constitución clorofila, ya que provienen de hojas y partes aéreas, teniendo en cuenta el fraccionamiento obtenido para cada extracto, las fracciones F1, F2 y F3 de *Nectandra* corresponden a un mayor contenido de clorofila y la fracción F2 de *Cissampelos*. La detección de clorofila está dada por la observación en TLC de un compuesto rojizo expuesto a UV 365 nm, a su vez tiene sentido su detección en las primeras fracciones por ser un compuesto de polaridad baja que eluye con las primeras combinaciones de solventes. Estas fracciones han mostrado un resultado menor de nitritos en la reacción de Griess pero no han sido consideradas para su estudio por tal motivo (**Figura 5.1**).

La actividad presentada por F4 y la observación de un solo pico mayoritario en el UV-DAD, motivó un estudio por espectrometría de masas. De tal manera para la relación masa carga 609 se puede proponer que es un diglicósido de quercetina, como los observados por Torres (2023), quercetin-3-O-neohesperidósido o quercetin-3-O-rhamnoglucósido (Torres et al., 2023). La detección de un compuesto de 431,1 m/z (PM 432) no ha sido reportada por Torres, esta transición podría dar lugar a una deoxihexosa de kaempferol por la pérdida de masa carga 146 y el resultado de un compuesto de relación 285. Dentro del género *Nectandra*, con esta estructura y coeficientes de absorción similares a los obtenidos (λ_1 264 nm y λ_2 343 nm) se encuentra reportado el rhamnósido de kaempferol (Da Silva et al., 2018; R. V. Pereira et al., 2020; A. B. Ribeiro et al., 2005), compuesto que recibe el nombre de Afzelin (432,4 g/mol). En particular la partición observada con CE 50 en compuestos de 285 y 255 m/z con un doble pico en 284-285 m/z (**Figura 5.5.C**) ($[\text{Y}_0-\text{H}]^-$ y $[\text{Y}_0]^-$) refuerza

esta hipótesis. Como se ha mencionado en el **capítulo III**, la observación de coloraciones verde-amarillentas en las TLC reveladas con DPBA podrían deberse a la presencia de derivados glicosilados de kaempferol, por lo que estaría en consonancia con el resultado hallado por espectrometría de masas. Esta primera aproximación a la caracterización estructural deberá ser respaldada por análisis futuros en LC-MS/MS con el patrón específico, o con otras técnicas de estudio estructural como RMN.

Los reportes de bioactividad de flavonoides son coincidentes en que las glicosilaciones, por lo general, disminuyen la actividad antioxidante y antiinflamatoria en comparación con formas agliconas (Slámová et al., 2018). Esto puede observarse en la comparativa de quercetina y rutina en liberación de nitritos ensayada, sin embargo plantea el interrogante de lo observado para NaE y sus fracciones ya que, tal como se ha discutido en el **capítulo III**, este presentaría compuestos glicosilados (Torres et al., 2023). No obstante se encuentran reportadas actividades antiinflamatorias para estos compuestos, por ejemplo diosmina (Diosmetin-7-O-rutinoside) es capaz de inhibir la activación de NF- κ B y el estrés oxidativo en un modelo inflamatorio *in vivo* (Fattori et al., 2020) o el compuesto vitexin (apigenina-8-C- β -D-glucopiranosido) disminuyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6 e IL-1 β) y los niveles de marcadores de estrés oxidativo en un modelo de dolor (Borghi et al., 2013). En este sentido, otros compuestos y comparativas han sido resumidos en una revisión reciente de la bibliografía (Xiao, 2017). Además, las glicosilaciones pueden ser deseadas desde el punto de la biodisponibilidad, la estabilidad y de la solubilidad de estos compuestos (Slámová et al., 2018).

Los análisis realizados para iNOS y COX-2 demuestran una reducción de niveles de expresión; en este caso no se estudió el efecto de los extractos en la actividad enzimática, sin embargo existen datos en la literatura sobre la actividad inhibitoria de flavonoides en COX-2 (Cui & Jia, 2021; D. Ribeiro et al., 2015). La mayoría de los estudios utiliza la expresión de iNOS y COX-2 como marcadores inflamatorios, por lo que su reducción implica un efecto antiinflamatorio deseado (Leyva-López et al., 2016). Correlaciones entre el tiempo de exposición y la expresión de iNOS y consecuente liberación de óxido nítrico para selectos compuestos agliconas de distintas familias de flavonoides han sido estudiados por otros autores, demostrando la importancia de la preincubación en el modelo experimental (Olszanecki et al., 2002).

La estimulación del receptor TLR4 por parte de LPS induce una señal vía MyD88 y activa la cascada de señalización de MAPK por un lado y por otro la vía de NF- κ B (Khan et al., 2022). Existe otra vía de activación independiente de MyD88 que resulta en la activación de factores reguladores de interferón y la estimulación de síntesis de la familia del interferón, esta vía de señalización ocurre con TLR4 endocitada y puede activar a la vía de NF- κ B de manera tardía (Rocha et al., 2016). La vía dependiente de MyD88 es la que culmina con la estimulación de síntesis de citoquinas proinflamatorias y mediadores del tipo COX-2 e iNOS (M. Pereira et al., 2022) por lo que se abordó esa parte de la vía. En cuanto a la activación de NF- κ B, en el caso de TLR4 se estimula la vía canónica de activación que culmina con la translocación al núcleo de un dímero de p50 p65 (Olędzka &

Czerwińska, 2023) y activación de los genes blancos, por lo que el primer paso en su estudio fue verificar dicha translocación tal como se había comprobado para NaE. Antes de este evento, p65 sufre una fosforilación y también es liberado de su inhibidor (I κ B), esta liberación implica una fosforilación de I κ B por lo que ambas modificaciones fueron estudiadas demostrando la implicación de la vía. En cuanto a la vía de las MAPK estas producen la fosforilación de ERK, p38 y JNK las cuales a su vez fosforilan AP-1 para su posterior translocación al núcleo y estímulo de genes blanco. AP-1 se encuentra compuesto por dos proteínas, c-FOS y c-JUN y se decidió el estudio de la fosforilación de una de ellas como representativa de la actividad sobre la vía. En estudios con el extracto entero se demostró la disminución de la fosforilación de p38, ERK y JNK (Crescitelli et al., 2023) por lo que se esperaba que la fracción activa replique estos efectos.

En el estudio de posibles blancos de acción de los compuestos presentes en el extracto se hipotetizó en la actividad por medio de los receptores TGR5 y LR-67. El TGR5 es un receptor de ácidos biliares que se ha relacionado con la acción de ciertos compuestos terpenoides en su actividad antiinflamatoria (He et al., 2021; Tanaka et al., 2024). En cuanto al receptor de laminina 67 (LR-67) se ha demostrado que la actividad de la epigallocatequina galato es realizada por medio del mismo y dada la similitud estructural con flavonoides glicosilados representaba un posible blanco de estudio (Kim et al., 2022). Para probar la actividad de estos receptores se utilizaron inhibidores descritos en la bibliografía (Pesapane et al., 2015; Tanaka et al., 2024) pero no fueron capaces de disminuir la bioactividad observada para F5 por lo que el mecanismo de acción involucrado debe ser otro.

La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos no es una actividad novel y se encuentra descrita ampliamente en la bibliografía; asimismo, la correlación entre estos efectos *in vitro* e *in vivo* no es directa y en gran parte este efecto se atribuye a un estímulo de las defensas celulares (Ruskovska et al., 2020). Dentro del efecto antioxidante, uno de los principales sensores a nivel celular es el factor de transcripción Nrf2, que se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo para realizar su actividad, promoviendo la transcripción de genes relacionados a la defensa antioxidante como NQO1, HO-1, enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión, entre otras (Tonelli et al., 2018). Esta actividad ocurre al censar niveles de ROS y de electrolitos, situación en la que se induce estrés y se inactiva Keap1, lo cual conduce a la estabilización de Nrf2 y translocación al núcleo. Una primera aproximación al estudio de esta vía fue realizada por Crescitelli y col. (Crescitelli et al., 2023), demostrando que NaE no produce diferencias en los niveles de Keap1 ni tampoco previene su activación inducida por LPS.

El estrés oxidativo es un componente común en diferentes patologías, en particular las células neuronales son especialmente susceptibles al daño oxidativo dado su contenido de ácidos grasos, consumo de oxígeno y pobre defensa antioxidante (Langasco et al., 2019), a estas características se suma la producción de neurotransmisores que presentan una fuente única de estrés oxidativo y que a su vez, causa una mayor producción de mediadores inflamatorios por parte de la glía (Shabab et al., 2017). Así, se diseñó para el estudio de la actividad antioxidante un modelo

de estímulo con CoCl_2 en células de microglía (BV-2). Si bien los mecanismos por los cuales el CoCl_2 genera estrés oxidativo no se encuentran bien establecidos, en un trabajo comparativo con otro inductor de hipoxia químico, el MnCl_2 , se apunta a un efecto primordial de los cationes Co^{2+} (Kotake-Nara & Saida, 2007). El mayor efecto de F5 se observó en una coincubación con el agente estresor, lo cual apoya la hipótesis de un efecto directo de flavonoides, más que del estímulo de la defensa antioxidante celular, ya que la preincubación no mejoró los niveles de ROS al exponer a CoCl_2 . En adición a las vías de señalización presentadas, existen vías de activación de Nrf2 independientes de Keap-1 (Ahmed et al., 2017), por lo que para profundizar en el estudio de la vía se decidió observar la expresión de la proteína HO-1 por western blot en células tratadas con CoCl_2 y la expresión de la proteína HIF-1 α , la cual es estabilizada por el tratamiento. Los resultados son concordantes con la hipótesis antes planteada, el extracto no promueve una activación de HO-1. La activación de la vía Nrf2 por flavonoides guarda relación con su estructura, de acuerdo con un reporte de 74 compuestos, las formas glicosiladas no presentaron acción en contraparte con las agliconas (con excepción de uno de los compuestos probados) (Li et al., 2018). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la sonda DCFH-DA, la expresión de proteínas relacionadas a la vía Nrf2 y la composición de F5 de flavonoides glicosilados, estos resultados son congruentes y explicarían la bioactividad observada.

La visualización de los flavonoides dentro de las células y cuantificación con técnicas de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo se puede realizar utilizando el mismo reactivo que para la detección por TLC (Chen et al., 2015; Ferrara & Thompson, 2019; Lee et al., 2014). Estas técnicas permitieron establecer que los flavonoides de F5 se encuentran dentro de las células de estudio al cumplirse 1 h de incubación y que su fluorescencia aumenta a las 24 h. Interesantemente, en la bibliografía se encuentra reportado una dificultad en el ingreso celular de flavonoides glicosilados en comparación con las contrapartes agliconas (Vissenaekens et al., 2019). Estas determinaciones presentan una primera aproximación al estudio y una vez conocida la composición exacta del extracto se podrán estudiar sus compuestos a nivel celular y cómo afectan sus metabolizaciones.

La utilización de HPLC preparativo como método de obtención de compuestos bioactivos se encuentra ampliamente descrita en la bibliografía. Existen ejemplos de su uso dentro del género *Nectandra* como etapa purificatoria en compuestos de interés (Conserva et al., 2021; Filho et al., 2010; A. B. Ribeiro et al., 2005), aún más importante, se encuentran descriptos métodos de obtención de flavonoides con una columna de la misma característica química (C18) (Wang et al., 2018; Youn et al., 2022). Resulta entonces extraña la falta de actividad observada para los compuestos, comparados con el extracto, habiéndose ensayado en las mismas concentraciones, lo que implicaría un enriquecimiento de al menos 10 veces el compuesto. Las hipótesis de la falta de actividad observada son variadas, podría deberse a la existencia de un efecto sinérgico de los flavonoides, a la presencia de compuestos que no se detecten en el UV-Vis pero que sirvan como

mediadores del efecto biológico, a alteraciones producidas por la columna o por los solventes implicados. Futuras investigaciones abordarán esta problemática.

CAPÍTULO VI

PROYECCIONES

Proyecciones

Dentro de los capítulos de resultados se han presentado y discutido las aplicaciones de la tinción con DPBA, en particular resultan interesantes las técnicas que la emplean en células como observación de la localización de los flavonoides y como medida de cuantificación. Este es un campo con potencial para el desarrollo de nuevos fluorocromos y para la detección de estos compuestos en estudios de biodisponibilidad, especialmente considerando el avance de la citometría de flujo espectral y los microscopios de fluorescencia espectrales, como el disponible en el Instituto de Botánica del Nordeste, que forma parte de esta Universidad. Las confirmaciones estructurales y aislamiento de compuestos puros facilitarán la caracterización espectroscópica y su uso para estas aplicaciones. Convirtiendo estos objetivos en una proyección directa de la tesis aquí presentada y extensible a otros compuestos de la familia que puedan ser aislados en la región.

En este capítulo se presentan algunos resultados preliminares de otras líneas experimentales que abren camino a investigaciones futuras.

Análisis del efecto producido en células BV-2 estimuladas con IL-4

La inhibición de la polarización hacia M1 demuestra un efecto antiinflamatorio por esa vía. Sin embargo, resulta interesante estudiar a su vez, si ocurre un estímulo de la polarización hacia estados antiinflamatorios similares a M2 *per se* o si exacerban el estímulo de otro agente polarizador. A su vez, se podría plantear que no son inhibidores específicos de la polarización con LPS si no que actúan como pan-inhibidores, en este sentido la estimulación con IL-4 resulta interesante.

La polarización celular de macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio se puede lograr al tratar las células con IL-4 recombinante, en particular esta polarización recibe el nombre de M(IL-4) en la nomenclatura actual (Murray et al., 2014). Para estudiar el efecto producido por la F5 de NaE en esta diferenciación, se adicionó 50 o 25 $\mu\text{g/mL}$ de F5 antes de añadir 20 ng/mL de IL-4. Se analizó la expresión de arginasa-1 como marcador M(IL-4) y se obtuvo lo mostrado en la **Figura P.1**.

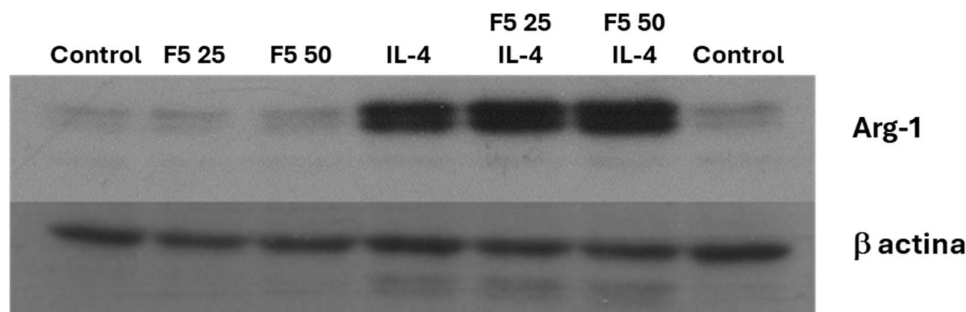


Figura P.1. Expresión de Arginasa-1 en células Bv2 tratadas con diferentes concentraciones de F5 de NaE (50 o 25 $\mu\text{g/mL}$) y/o IL-4 20 ng/mL por 24h. Se incluye β actina como proteína normalizadora de la carga. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Se evidencia que el extracto solo no es capaz de inducir la expresión de Arg-1, por lo que no presentaría una actividad polarizadora a “M2” por sí mismo. A su vez, tampoco la evitaría al recibir el estímulo de IL-4. Estas conclusiones preliminares se dan con un solo marcador, lo cual no es suficiente para sostenerlo como afirmación y naturalmente, se necesitan evaluar otros marcadores de este fenotipo como Fizz1, YM-1, CD-206 para confirmar estos resultados. Resulta interesante notar que al no inhibir la expresión de Arg-1, la señalización por STAT-6 probablemente se encuentre activa y su cascada de fosforilación no se haya visto afectada.

Siguiendo la misma línea de pensamiento, se podrían estudiar otros estímulos activadores de M2 like, como pueden ser IL-10 e inmunocomplejos, o de otros activadores de TLR como poly(I:C) de TLR3.

Estudio del efecto en estrés de retículo inducido por Tunicamicina

El estudio del estrés de retículo ocasionado por Tunicamicina revela otra arista interesante del efecto de NaE, en particular de F5. En ensayos de viabilidad se observa un efecto protector de F5 en comparación con TUN, pero resulta incapaz de evitar la aparición de los marcadores de estrés de retículo en las células. Esto sugiere la hipótesis de que el efecto de F5 no radica en la inhibición del mecanismo del estrés, sino en la contención de los daños posteriores, como el estrés oxidativo generado.

La tunicamicina es un antibiótico que inhibe la glicosilación de proteínas induciendo estrés de retículo (ER) por acumulación de proteínas incorrectamente plegadas. En diversas patologías neuroinflamatorias, este plegado anómalo de proteínas conlleva al progreso de la enfermedad. Por ello, para su estudio se indujo ER en células Bv2 con tunicamicina. En primera instancia se determinó una concentración de trabajo que resultara no tóxica para las células en el tiempo de estudio, y se corroboró el efecto del extracto en dosis citotóxicas de tunicamicina. Luego se analizó por western blot la expresión de proteínas relacionadas con el ER, como GRP78, GRP94 y CHOP.

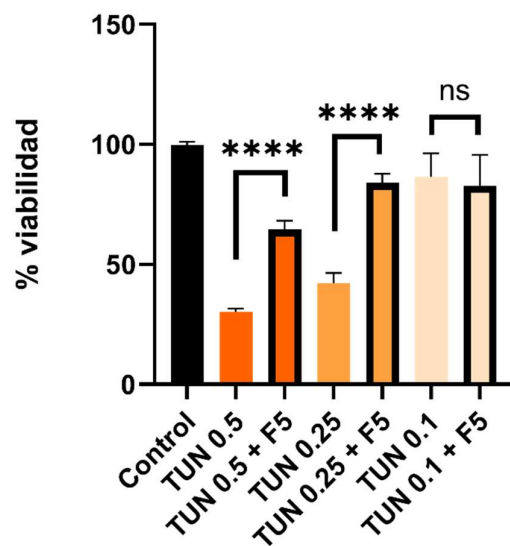


Figura P.2. Viabilidad de células Bv2 expuestas a diferentes dosis de tunicamicina y 50 µg/mL de F5 de NaE. Los resultados se muestran como promedio y desvío estándar. El gráfico es representativo de 3 experimentos independientes.

La concentración de trabajo elegida para la expresión de proteínas es de 0,1 µg/mL de tunicamicina debido a que dosis mayores presentan una disminución en la viabilidad celular. A su vez, se observa una mejor sobrevida en las células expuestas al extracto previo al estímulo con tunicamicina.

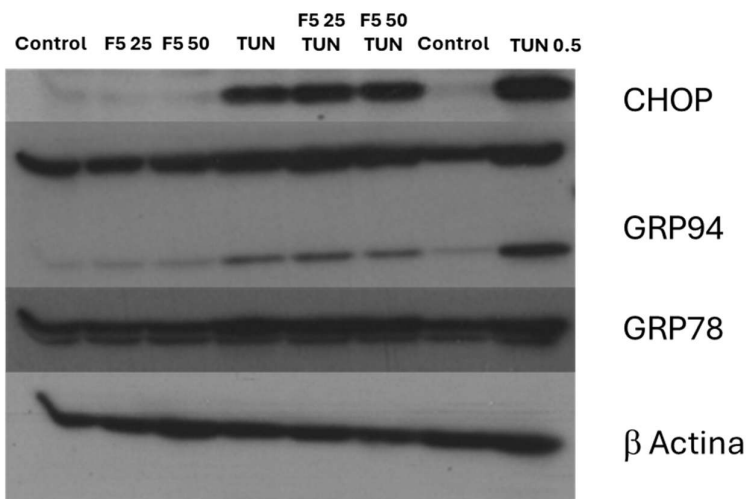


Figura P.3. Expresión de proteínas en células Bv2 tratadas con diferentes concentraciones de F5 50 o 25 µg/mL) y con TUN 0,1 µg/mL por 24h. Se incluye β actina como proteína normalizadora de la carga. Se incluye un control positivo con TUN 0,5 µg/mL por 24h. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

La fracción analizada no tiene acción en la inducción de estrés de retículo *per se*, pero tampoco disminuye la expresión de las proteínas inducidas por la misma (CHOP, GRP94 y GRP78) por lo que su mecanismo de acción sería independiente de esta vía.

Una hipótesis posible del efecto observado es que reduzca el estrés a nivel oxidativo o sobre otras moléculas de interés retrasando el efecto citotóxico del estrés de retículo.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Conclusiones

En línea con el objetivo general, en la presente tesis, se profundizó en el conocimiento sobre la extracción y caracterización de flavonoides activos de las especies vegetales autóctonas *Nectandra angustifolia* y *Cissampelos pareira*. Asimismo, también se aporta evidencia sólida sobre sus efectos biológicos como antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales por estudios multiparamétricos *in vivo* e *in vitro* para su futura aplicación en fitoterapia.

Se obtuvieron extractos etanólicos a partir de las partes aéreas de *N. angustifolia* y *C. pareira* y se caracterizaron sus contenidos de fenoles y flavonoides. En tal sentido, NaE mostró mayor contenido de fenoles y flavonoides, y, en consonancia, una mejor actividad antioxidante.

Se determinó la actividad citotóxica para NaE y CpE en diversas líneas tumorales humanas y su comparación con líneas no tumorales, pero las mismas no mostraron valores que justifiquen futuras investigaciones al respecto.

Se comprobó que NaE presenta un mayor efecto antiinflamatorio que CpE en los modelos celulares *in vitro* estudiados mediante técnicas multiparamétricas. Este efecto fue observado tanto en cultivos de macrófagos tradicionales como en células de microglía. Las capacidades antiinflamatorias de NaE se comprobaron en modelos *in vivo*, donde la administración intraperitoneal del extracto redujo los efectos proinflamatorios inducidos por formalina. Asimismo, en un modelo de inflamación sistémica provocado por LPS, los extractos lograron disminuir los marcadores proinflamatorios en cerebro de ratón.

Se realizó el fraccionamiento de NaE y CpE con un cribado de las propiedades antiinflamatorias mediante el cual se seleccionaron las fracciones que tuvieran bioactividad.

Por otro lado, esta tesis aporta evidencias iniciales del mecanismo de acción de NaE. En tal sentido se demostró el involucramiento de la vía de activación NF- κ B en la traducción de señal de NaE como antiinflamatorio, y en particular de su fracción activa F5, al limitar la fosforilación de su inhibidor (I κ B), la fosforilación de p65 y la consecuente traslocación al núcleo. Adicionalmente, se confirmó una reducción de la fosforilación de la vía de las MAPK por medio de la detección de fosforilación de c-JUN al tratar las células con F5 antes de la estimulación con LPS.

Se estudió, además, el mecanismo de acción antioxidante ejercido por la fracción F5 de NaE a nivel celular, los datos obtenidos permiten postular una acción directa sobre especies reactivas y no un estímulo de la defensa antioxidante celular.

Finalmente, se observó el ingreso de compuestos compatibles con flavonoides al interior de las células tratadas con F5 de NaE, y se vio su acumulación en las horas posteriores.

De este modo, los resultados obtenidos en esta tesis no solo contribuyen a la base científica para la utilización de compuestos naturales en medicina, sino que también abren el camino para futuras investigaciones de profundización en el potencial antiinflamatorio de *Nectandra angustifolia*, con el objetivo de optimizar su futura aplicación clínica.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). *Cellular and Molecular Immunology E-Book: Cellular and Molecular Immunology E-Book*. Elsevier.
<https://books.google.com.ar/books?id=1x0fEAAAQBAJ>
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., & Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Astudillo, A. M., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2023). Compartmentalized regulation of lipid signaling in oxidative stress and inflammation: Plasmalogens, oxidized lipids and ferroptosis as new paradigms of bioactive lipid research. *Progress in Lipid Research*, 89(November 2022), 101207. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101207>
- Baba, S. A., & Malik, S. A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*, 9(4), 449–454.
<https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001>
- Badilla, B., Chaves, F., Jiménez, S., Rodríguez, G., & Poveda, L. J. (2008). Effects of an extract of *Cissampelos pareira* on the hemorrhagic and proteolytic activities from *Bothrops asper* venom. *Pharmacognosy Magazine*, 4(13), 27–31.
- Bala, M., Pratap, K., Verma, P.K., Padwad, Y., Singh, B. (2015). Cytotoxic agents for KB and SiHa cells from n-hexane fraction of *Cissampelos pareira* and its chemical composition. *Natural Products Research*, 29, 686–691. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.984183>
- Barakat, M., Syed, N.K., Hasen, E., Abdulrazzaq, S.B., Thiab, S., Al-Najjar, M.A.A., Omar, A., Lucy, T.T., Mamun-Or-Rashid, A.N.M., Yagi, M., Yonei, Y. (2023). The effect of natural products on inflammatory cytokines production and secretion. *Phytomedicine Plus*.
<https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100488>
- Bar-Hai, N., & Ishay-Ronen, D. (2022). Engaging plasticity: Differentiation therapy in solid tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 13(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.944773>
- Batista, C.R.A., Gomes, G.F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B.L., de Oliveira, A.C.P. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2293.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 345–352.
<https://doi.org/10.1038/nri2747>
- Bellavite, P. (2023). Neuroprotective Potentials of Flavonoids: Experimental Studies and

- Mechanisms of Action. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox12020280>
- Bertucci, A., Haretche, F., Olivaro, C., & Vázquez, A. (2008). Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(1), 21–25. <http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/>
- Bhatla, S. C. (2018). *Secondary Metabolites. Plant Physiology, Development and Metabolism* (Vol. 1, pp. 1099–1166). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_33
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 11(10), 889–896. <https://doi.org/10.1038/ni.1937>
- Bligh, S. W. A., Ogegbo, O., & Wang, Z. T. (2013). *Flavonoids by HPLC. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 2107–2144). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_97
- Borghi, S. M., Carvalho, T. T., Staurengo-Ferrari, L., Hohmann, M. S. N., Pinge-Filho, P., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2013). Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1141–1146. <https://doi.org/10.1021/np400222v>
- Borghi-Pangoni, F. B., Tunin, L. M., Bonifácio, K. L., Nogueira, A. C., Hernandez, L., Yamashita, F., Barbosa, D. S., Baesso, M. L., da Truiti, M. C. T., & Diniza, A. (2015). Nectandra falcifolia: Potential phytopharmaceutical for skin damage protection designed by statistical approach and characterized by photoacoustic spectroscopy. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(3), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.012>
- Castaño, A., Herrera, A. J., Cano, J., & Machado, A. (2002). The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF- α , IL-1 β and IFN- γ . *Journal of Neurochemistry*, 81(1), 150–157. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00799.x>
- Cavaillon, J.-M. (2021). Once upon a time, inflammation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0147>
- Chen, C.C., Lin, M.W., Liang, C.J., Wang, S.H. (2016). The anti-inflammatory effects and mechanisms of eupafolin in lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 Macrophages. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158662>
- Chen, H., Pu, J., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., Xiang, Z., He, N. (2016). Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.). *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153080>
- Chen, J., Song, M., Wu, X., Zheng, J., He, L., McClements, D. J., Decker, E., & Xiao, H. (2015). Direct Fluorescent Detection of a Polymethoxyflavone in Cell Culture and Mouse Tissue. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 63(49), 10620–10627.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04484>
- Chen, W.F., Shih, Y.H., Liu, H.C., Cheng, C.I., Chang, C.I., Chen, C.Y., Lin, I.P., Lin, M.Y., Lee, C.H. (2022). 6-methoxyflavone suppresses neuroinflammation in lipopolysaccharide- stimulated microglia through the inhibition of TLR4/MyD88/p38 MAPK/NF- κ B dependent pathways and the activation of HO-1/NQO-1 signaling. *Phytomedicine*.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154025>
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., & Wang, Y. (2010). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*, 44(6), 587–604.
<https://doi.org/10.3109/10715761003709802>
- Conserva, G. A. A., Quiros-Guerrero, L. M., Costa-Silva, T. A., Marcourt, L., Pinto, E. G., Tempone, A. G., Fernandes, J. P. S., Wolfender, J. L., Queiroz, E. F., & Lago, J. H. G. (2021). Metabolite profile of *Nectandra oppositifolia* Nees & Mart. And assessment of antitrypanosomal activity of bioactive compounds through efficiency analyses. *PLoS ONE*, 16(2 February 2021).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247334>
- Coutinho-Wolino, K.S., Almeida, P.P., Mafra, D., Stockler-Pinto, M.B. (2022). Bioactive compounds modulating Toll-like 4 receptor (TLR4)-mediated inflammation: pathways involved and future perspectives. *Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2022.09.001>
- Crescitelli, M. C., Simon, I., Ferrini, L., Calvo, H., Torres, A. M., Cabero, I., Panedas, M. M., Rauschemberger, M. B., Aguirre, M. V., Rodríguez, J. P., Hernández, M., & Nieto, M. L. (2023). Anti-Neuroinflammatory Potential of a *Nectandra angustifolia* (Laurel Amarillo) Ethanolic Extract. *Antioxidants*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020232>
- Cruz-Pérez, A., Barrera-Ramos, J., Bernal-Ramírez Luis, A., Bravo-Avilez, D., & Rendón-Aguilar, B. (2021). Actualized inventory of medicinal plants used in traditional medicine in Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13002-020-00431-y>
- Cui, J., & Jia, J. (2021). Natural COX-2 Inhibitors as Promising Anti-inflammatory Agents: An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 28(18), 3622–3646.
<https://doi.org/10.2174/0929867327999200917150939>
- da Silva Mendes, J. W., Cunha, W. E. M., Rodrigues, F. F. G., Silveira, E. R., de Lima, R. D. P., & da Costa, J. G. M. (2020). Cissampelos genus: biological activities, ethnobotanical and phytochemical aspects. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 955–982.
<https://doi.org/10.1007/s11101-020-09695-4>
- Da Silva, D. T., Herrera, R., Heinzmann, B. M., Calvo, J., & Labidi, J. (2018). *Nectandra grandiflora* by-products obtained by alternative extraction methods as a source of phytochemicals with

- antioxidant and antifungal properties. *Molecules*, 23(2), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/molecules23020372>
- Darzynkiewicz, Z., Halicka, H.D., Zhao, H. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 675, 137–147.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6199-0_9
- de S. Farias, K., Delatte, T., do C. de O. Arruda, R., Alves, F. M., Silva, D. B., Beekwilder, J., & Carollo, C. A. (2018). In depth investigation of the metabolism of *Nectandra megapotamica* chemotypes. *PLoS ONE*, 13(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201996>
- de Sousa, F.S., Nunes, E.A., Gomes, K.S., Cerchiaro, G., Lago, J.H.G. (2019). Genotoxic and cytotoxic effects of neolignans isolated from *Nectandra leucantha* (Lauraceae). *Toxicology in Vitro*. 55, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.12.011>
- De Ruysscher, D., Niedermann, G., Burnet, N. G., Siva, S., Lee, A. W. M., & Hegi-Johnson, F. (2019). Radiotherapy toxicity. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 13.
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0064-5>
- Debenedetti, S. (2016). *TLC and PC in Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals Traditional medicinal plants as source for Phytocosmetic and dermatological products* 104–134.
- Dirsch, V. M., Stuppner, H., & Vollmar, A. M. (1998). The griess assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Medica*, 64(5), 423–426.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-957473>
- Dunkhunthod, B., Talabnin, C., Murphy, M., Thumanu, K., Sittisart, P., Eumkeb, G. (2021). *Gymnema inodorum* (Lour.) Decne. Extract Alleviates Oxidative Stress and Inflammatory Mediators Produced by RAW264.7 Macrophages. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
<https://doi.org/10.1155/2021/8658314>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 329–360.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Fattori, V., Rasquel-Oliveira, F. S., Artero, N. A., Ferraz, C. R., Borghi, S. M., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2020). Diosmin Treats Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Pain and Peritonitis by Blocking NF-κB Activation in Mice. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1018–1026.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00887>
- Ferrara, B. T., & Thompson, E. P. (2019). A method for visualizing fluorescence of flavonoid therapeutics in vivo in the model eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *BioTechniques*, 66(2), 65–71. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0084>
- Ferrante, C. J., & Leibovich, S. J. (2012). Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing.

- Advances in Wound Care*, 1(1), 10–16. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0307>
- Ferrante, C. J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B. N., Hasko, G., Outram, S., & Leibovich, S. J. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation*, 36(4), 921–931. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9621-3>
- Filho, A. A. da S., Silva, M. L. A. e, Carvalho, J. C. T., & Bastos, J. K. (2010). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(9), 1179–1184. <https://doi.org/10.1211/0022357044058>
- Flecknell, P. (2009). Laboratory Animal Anaesthesia. In *Laboratory Animal Anaesthesia*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369376-1.X0001-9>
- Fu, K.-Y. Y., Light, A. R. R., & Maixner, W. (2000). Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience*, 101(4), 1127–1135. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00376-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00376-6)
- Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G. M., Peng, B., Uwagawa, T., Li, Z., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., & Chiao, P. J. (2004). NF- κ B and AP-1 Connection: Mechanism of NF- κ B-Dependent Regulation of AP-1 Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7806–7819. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7806-7819.2004>
- Ghareeb, M. A., Tammam, M. A., El-Demerdash, A., & Atanasov, A. G. (2020). Insights about clinically approved and Preclinically investigated marine natural products. *Current Research in Biotechnology*, 2, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.09.001>
- Gilbert, D.F. (2017). Cell Viability Assays, *Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9>
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 392–404). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Giovannini, P., & Howes, M. J. R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199(February), 240–256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.011>
- González Torres, D.M., (1992). Catálogo de plantas medicinales (y alimenticias y útiles) usadas en Paraguay. Servilibro, Asunción, Paraguay
- Graeber, M.B., Li, W., Rodriguez, M.L., (2011). Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett.* 585, 3798–3805. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.033>
- Grecco, S. S., Lorenzi, H., Tempone, A. G., & Lago, J. H. G. (2016). Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae). In *Tetrahedron Asymmetry* (Vol. 27, Issues 17–18,

- pp. 793–810). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.07.009>
- Gupta, A., Pandey, S., Shah, D. R., Seth, N. R., & Yadav, J. S. (2011). Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaves of *Cissampelos pareira*. *Pharmacognosy Journal*, 3(21), 25–28. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.21.4>
- Hamsalakshmi, Alex, A. M., Arehally Marappa, M., Joghee, S., & Chidambaram, S. B. (2022). Therapeutic benefits of flavonoids against neuroinflammation: a systematic review. *Inflammopharmacology*, 30(1), 111–136. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00895-8>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hasnat, H., Shompa, S. A., Islam, M. M., Alam, S., Richi, F. T., Emon, N. U., Ashrafi, S., Ahmed, N. U., Chowdhury, M. N. R., Fatema, N., Hossain, M. S., Ghosh, A., & Ahmed, F. (2024). Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials. *Heliyon*, 10(6), e27533. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27533>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF-κB Signaling. In *Cell* (Vol. 132, Issue 3, pp. 344–362). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- He, B., Jiang, J., Shi, Z., Wu, L., Yan, J., Chen, Z., Luo, M., Cui, D., Xu, S., Yan, M., Zhang, S., & Chen, Z. (2021). Pure total flavonoids from citrus attenuate non-alcoholic steatohepatitis via regulating the gut microbiota and bile acid metabolism in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111183>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Heinrich, M., Barnes, J., Prieto García, J. M., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2018). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy* (Third). Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/fundamentals-of-pharmacognosy-and-phytotherapy/heinrich/978-0-7020-7008-2?aref=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>
- Hirohashi, N., Lei, M. G., & Morrison, D. C. (1999). LPS pretreatment of mouse peritoneal macrophages differentially modulates TNFα and iNOS expression. *Innate Immunity*, 5(5–6), 251–260. <https://doi.org/10.1177/09680519990050050101>
- Hiromoto, T., Honjo, E., Noda, N., Tamada, T., Kazuma, K., Suzuki, M., Blaber, M., & Kuroki, R. (2015). Structural basis for acceptor-substrate recognition of UDP-glucose: Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase from *Clitoria ternatea*. *Protein Science*, 24(3), 395–407. <https://doi.org/10.1002/pro.2630>
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, 13(10), 714–726.

<https://doi.org/10.1038/nrc3599>

- Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A., Shahbaz, M., Tsouh Fokou, P. V., Umair Arshad, M., Khan, H., Guerreiro, S. G., Martins, N., & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/molecules24122277>
- Kacem, M., Simon, G., Leschiera, R., Misery, L., ElFeki, A., Lebonvallet, N. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ruta chalepensis* L. extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 51, 128–141. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9813-7>
- Khan, A., Khan, S. U., Khan, A., Shal, B., Rehman, S. U., Rehman, S. U., Htar, T. T., Khan, S., Anwar, S., Alafnan, A., & Rengasamy, K. R. R. (2022). Anti-Inflammatory and Anti-Rheumatic Potential of Selective Plant Compounds by Targeting TLR-4/AP-1 Signaling: A Comprehensive Molecular Docking and Simulation Approaches. *Molecules*, 27(13). <https://doi.org/10.3390/molecules27134319>
- Kim, S. R., Seong, K. J., Kim, W. J., & Jung, J. Y. (2022). Epigallocatechin Gallate Protects against Hypoxia-Induced Inflammation in Microglia via NF- κ B Suppression and Nrf-2/HO-1 Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23074004>
- Kim, S.Y., Jin, C.Y., Kim, C.H., Yoo, Y.H., Choi, S.H., Kim, G.Y., Yoon, H.M., Park, H.T., Choi, Y.H. (2019). Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- κ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation. *International Journal of Molecular Medicine*. 43, 682–692. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3993>
- Kotas, M. E., & Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell*, 160(5), 816–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.010>
- Kumar, H., Kim, I.-S., More, S. V., Kim, B.-W., & Choi, D.-K. (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural Product Reports*, 31(1), 109–139. <https://doi.org/10.1039/C3NP70065H>
- Kumari, S., Anmol, Bhatt, V., Suresh, P.S., Sharma, U. (2021). *Cissampelos pareira* L.: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113850>
- Langasco, R., Fancello, S., Rassu, G., Cossu, M., Cavalli, R., Galleri, G., Giunchedi, P., Migheli, R., & Gavini, E. (2019). Increasing protective activity of genistein by loading into transfersomes: A new potential adjuvant in the oxidative stress-related neurodegenerative diseases? *Phytomedicine*, 52, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.207>
- Latif, Z., & Sarker, S. D. (2012). Isolation of Natural Products by Preparative High Performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC). In *Natural Products Isolation* (pp. 255–274).

https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_10

- Lee, J. H., Kim, Y., Hoang, M. H., Jun, H. jin, & Lee, S. J. (2014). Rapid quantification of cellular flavonoid levels using quercetin and a fluorescent diphenylboric acid 2-amino ethyl ester probe. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 75–79. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0010-y>
- Lee, M. J., Jang, M., Jung, H. S., Kim, S. H., & Cho, I. H. (2012). Ethyl pyruvate attenuates formalin-induced inflammatory nociception by inhibiting neuronal ERK phosphorylation. *Molecular Pain*, 8. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-40>
- Leuti, A., Fazio, D., Fava, M., Piccoli, A., Oddi, S., & Maccarrone, M. (2020). Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 133–169. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.028>
- Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Perez, D.L., Basilio Heredia, J. (2016a). Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17060921>
- Leyva-López, N., Nair, V., Bang, W.Y., Cisneros-Zevallos, L., Heredia, J.B. (2016b). Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 187, 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.051>
- Li, Y. R., Li, G. H., Zhou, M. X., Xiang, L., Ren, D. M., Lou, H. X., Wang, X. N., & Shen, T. (2018). Discovery of natural flavonoids as activators of Nrf2-mediated defense system: Structure-activity relationship and inhibition of intracellular oxidative insults. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(18), 5140–5150. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.09.010>
- Li, R., Zhou, Y., Zhang, S., Li, J., Zheng, Y., Fan, X. (2022). The natural (poly)phenols as modulators of microglia polarization via TLR4/NF-κB pathway exert anti-inflammatory activity in ischemic stroke. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174660>
- Li, S.Y., Zhou, Y. Le, He, D.H., Liu, W., Fan, X.Z., Wang, Q., Pan, H.F., Cheng, Y.X., Liu, Y.Q. (2020). Centipeda minima extract exerts antineuroinflammatory effects via the inhibition of NF-κB signaling pathway. *Phytomedicine*. 67. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153164>
- Li, Z., Chu, S., He, W., Zhang, Z., Liu, J., Cui, L., Yan, X., Li, D., Chen, N. (2019). A20 as a novel target for the anti-neuroinflammatory effect of chrysin via inhibition of NF-κB signaling pathway. *Brain, Behavior and Immunity*. 79, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.005>
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 17, pp. 3221–3247). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>

- Macías-Villamizar, V. E., Cuca-Suárez, L. E., & Coy-Barrera, E. D. (2015). Genus nectandra: "Phytochemistry and biological activity." *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 14(4), 317–342.
- Mahmud, A. R., Ema, T. I., Siddiquee, M. F. R., Shahriar, A., Ahmed, H., Mosfeq-Ul-Hasan, M., Rahman, N., Islam, R., Uddin, M. R., & Mizan, M. F. R. (2023). Natural flavonols: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for various diseases. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-023-00387-4>
- Man, S., Wang, J., Gao, W., Guo, S., Li, Y., Zhang, L., Xiao, P. (2013). Chemical analysis and anti-inflammatory comparison of the cell culture of Glycyrrhiza with its field cultivated variety. *Food Chemistry*. 136, 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.010>
- Mannan, M. A., Khatun, A., & Khan, M. F. H. (2017). Antinociceptive effect of methanol extract of Dalbergia sissoo leaves in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1565-y>
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, 229(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Markham, K. R., & Mabry, T. J. (1975). Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. *The Flavonoids*, 45–77. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2909-9_2
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6(March), 1–13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 378(5), 439–448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>
- Méndez-González, M. E., Torres-Avilez, W. M., Dorantes-Euán, A., & Durán-García, R. (2014). Jardines medicinales en yucatán: Una alternativa para la conservación de la flora medicinal de los mayas. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 37(2), 97–106.
- Mera, I. F. G., Falconí, D. E. G., & Córdova, V. M. (2019). Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. In *Bionatura* (Vol. 4, Issue 4). Centro de Biotecnología y Biomedicina, Clinical Biotec. Universidad Católica del Oriente (UCO), Univesidad Yachay Tech. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.04.11>

- Mills, C. D. (2012). M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(6), 463–488. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10>
- Mills, C. D. (2015). Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6), 963–975. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010>
- Moghaddam, G., Ebrahimi, S. A., Rahbar-Roshandel, N., & Foroumadi, A. (2012). Antiproliferative activity of flavonoids: Influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure. *Phytotherapy Research*, 26(7), 1023–1028. <https://doi.org/10.1002/ptr.3678>
- Mohammad F., E., Hasan, W.A., Mohamed, E.G. (2017). Natural antioxidant flavonoids in formalin-induced mice paw inflammation; inhibition of mitochondrial sorbitol dehydrogenase activity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 31. <https://doi.org/10.1002/jbt.21896>
- Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(December 2003), 211–219. <https://doi.org/10.1287/isre.6.2.144>
- Morita, H., Matsumoto, K., Takeya, K., Itokawa, H., Iitaka, Y. (1993). A Novel Antileukemic Tropoloisoquinoline Alkaloid, Pareirubrine, from *Cissampelos pareira*. *Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1246/cl.1993.339>
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., ... Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>
- Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*, 79, 541–566. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 1, pp. 14–20). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.

- Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Nair, V., Bang, W.Y., Schreckinger, E., Andarwulan, N., Cisneros-Zevallos, L. (2015). Protective Role of Ternatin Anthocyanins and Quercetin Glycosides from Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) Blue Flower Petals against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63, 6355–6365. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00928>
- Nguyen, N.H., Hoai Ta, Q.T., Pham, Q.T., Han Luong, T.N., Phung, V.T., Duong, T.H., Vo, V.G. (2020). Anticancer activity of novel plant extracts and compounds from *Adenosma bracteosum* (Bonati) in human lung and liver cancer cells. *Molecules*. 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25122912>
- Nonnenmacher, Y., & Hiller, K. (2018). Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(12), 2093–2109. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2784-1>
- Odegaard, J. I., & Chawla, A. (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 275–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130138>
- Ołędzka, A. J., & Czerwińska, M. E. (2023). Role of Plant-Derived Compounds in the Molecular Pathways Related to Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/ijms24054666>
- Oliva, P., Aurilio, C., Massimo, F., Grella, A., Maione, S., Grella, E., Scafuro, M., Rossi, F., & Berrino, L. (2002). The antinociceptive effect of tramadol in the formalin test is mediated by the serotonergic component. *European Journal of Pharmacology*, 445(3), 179–185. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01647-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01647-3)
- Oliveira, M. M. de, Daré, R. G., Barizão, É. O., Visentainer, J. V., Romagnolo, M. B., Nakamura, C. V., & Truiti, M. da C. T. (2018). Photodamage attenuating potential of *Nectandra hihua* against UVB-induced oxidative stress in L929 fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 181, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.03.008>
- Oliveira De Melo, J., Truiti, M.D.C.T., Muscará, M.N., Bolonheis, S.M., Dantas, J.A., Caparroz-Assef, S.M., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A. (2006). Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29, 2241–2245. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2241>
- Olszanecki, R., Gebaska, A., Kozlovski, V. I., & Gryglewski, R. J. (2002). Flavonoids and nitric oxide synthase. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 53(4 Pt 1), 571–584.
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2003). The Use of RT-qPCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. *Journal Biomolecular*

TECHNIQUES, 14(1), 33–43.

- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. In *Journal of Nutritional Science* (Vol. 5). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 45, Issue 12). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- Patil, K.R., Mahajan, U.B., Unger, B.S., Goyal, S.N., Belemkar, S., Surana, S.J., Ojha, S., Patil, C.R. (2019). Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>
- Pereira, M., Durso, D.F., Bryant, C.E., Kurt-Jones, E.A., Silverman, N., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. (2022). The IRAK4 scaffold integrates TLR4-driven TRIF and MYD88 signaling pathways. *Cell Reports*. 40, 111225. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111225>
- Pereira, R. V., Mecnas, A. S., Malafaia, C. R. A., Amaral, A. C. F., Muzitano, M. F., Simas, N. K., & Correa Ramos Leal, I. (2020). Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of extracts and fractions of *Ocotea notata* (Ness) Mez (Lauraceae). *Natural Product Research*, 34(20), 3004–3007. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602828>
- Pesapane, A., Di Giovanni, C., Rossi, F. W., Alfano, D., Formisano, L., Ragno, P., Selleri, C., Montuori, N., & Lavecchia, A. (2015). Discovery of new small molecules inhibiting 67 kDa laminin receptor interaction with laminin and cancer cell invasion. *Oncotarget*, 6(20), 18116–18133. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4016>
- Ponci, V., Figueiredo, C.R., Massaoka, M.H., De Farias, C.F., Matsuo, A.L., Sartorelli, P., Lago, J.H.G. (2015). Neolignans from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) display in vitro cytotoxic activity and induce apoptosis in leukemia cells. *Molecules*. 20, 12757–12768. <https://doi.org/10.3390/molecules200712757>
- Poudel, S., Sapkota, B., Timilsina, P., Parajuli, K., & Kaundinyayana, A. (2019). Phytochemical analysis , in vitro antioxidant activity and in vivo anti-inflammatory and analgesic activities of selected medicinal plants of Nepal. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(6), 14–25.
- Rachsee, A., Chiranthanut, N., Kunnaja, P., Sireeratawong, S., Khonsung, P., Chansakaow, S., Panthong, A. (2021). *Mucuna pruriens* (L.) DC. seed extract inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 267, 113518. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113518>

- Ran, Y., Qie, S., Gao, F., Ding, Z., Yang, S., Tian, G., Liu, Z., Xi, J. (2021). Baicalein ameliorates ischemic brain damage through suppressing proinflammatory microglia polarization via inhibiting the TLR4/NF- κ B and STAT1 pathway. *Brain Research*. 1770, 147626. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147626>
- Rauter, A. P., Ennis, M., Hellwich, K. H., Herold, B. J., Horton, D., Moss, G. P., & Schomburg, I. (2018). Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). In *Pure and Applied Chemistry* (Vol. 90, Issue 9). <https://doi.org/10.1515/pac-2013-0919>
- Ribeiro, A. B., Bolzani, V. D. S., Yoshida, M., Santos, L. S., Eberlin, M. N., & Silva, D. H. S. (2005). A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3 B), 526–530. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000400005>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S. M., Silva, A. M. S., Laufer, S., Lima, J. L. F. C., & Fernandes, E. (2015). Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/Chemokine Production in Human Whole Blood. *Inflammation*, 38(2), 858–870. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9995-x>
- Ricciardi Verrastro, B., Maria Torres, A., Ricciardi, G., Teibler, P., Maruñak, S., Barnaba, C., Larcher, R., Nicolini, G., & Dellacassa, E. (2018). The effects of *Cissampelos pareira* extract on envenomation induced by *Bothrops diporus* snake venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.015>
- Rocha, D. M., Caldas, A. P., Oliveira, L. L., Bressan, J., & Hermsdorff, H. H. (2016). Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. In *Atherosclerosis* (Vol. 244, pp. 211–215). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015>
- Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). El lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, 37–45. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542010000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Ruskovska, T., Maksimova, V., & Milenkovic, D. (2020). Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability – an overview and perspective. *British Journal of Nutrition*, 123(3), 241–254. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002733>
- Sadeer, N. B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 8, pp. 1–39). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., & Saso, L. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*, 25(22), 5474. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2012). An Introduction to Natural Products Isolation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 864, pp. 1–25). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_1

- Semwal, D. K., Semwal, R. B., Vermaak, I., & Viljoen, A. (2014). From arrow poison to herbal medicine - The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of Cissampelos (Menispermaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2), 1011–1028. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.054>
- Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*. 69, 273–8. <https://doi.org/10.1017/S002966511000162X>
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S.Z., Kadir, H.A., Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Singh, R. P., Raina, K., Sharma, G., & Agarwal, R. (2008). Silibinin inhibits established prostate tumor growth, progression, invasion, and metastasis and suppresses tumor angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model mice. *Clinical Cancer Research*, 14(23), 7773–7780. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1309>
- Singleton, V. . L., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebbb-2-1-5>
- Slámová, K., Kapešová, J., & Valentová, K. (2018). “Sweet Flavonoids”: Glycosidase-Catalyzed Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19072126>
- Soromou, L.W., Zhang, Z., Li, R., Chen, N., Guo, W., Huo, M., Guan, S., Lu, J., Deng, X. (2012). Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-O-methyl-naringenin. *Molecules*. 17, 3574–3585. <https://doi.org/10.3390/molecules17033574>
- Stefova, M., Stafilov, T., & Kulevanova, S. (2003). HPLC analysis of flavonoids. In J. Cazes (Ed.), *Encyclopedia of Chromatography*. Marcel Dekker, Inc. <https://doi.org/10.1081/E-ECHR>
- Taghizadieh, M., Modiri, N., Salmaninejad, A., Khayami, R., Taheri, F., Moghoofei, M., Khatami, A., Azhdari, S., Bayat, M., Samadi-khouzani, A., Sadri Nahand, J. (2023). Neuroprotective effects of flavonoids, in: *Phytonutrients and Neurological Disorders: Therapeutic and Toxicological Aspects*. Elsevier, pp. 133–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824467-8.00016-4>
- Talib, W. H., Awajan, D., Alqudah, A., Alsawwaf, R., Althunibat, R., Abu AlRoos, M., Al Safadi, A., Abu Asab, S., Hadi, R. W., & Al Kury, L. T. (2024). Targeting Cancer Hallmarks with Epigallocatechin

- Gallate (EGCG): Mechanistic Basis and Therapeutic Targets. *Molecules*, 29(6), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules29061373>
- Tanaka, C., Harada, N., Teraoka, Y., Urushizaki, H., Shinmori, Y., Onishi, T., Yotsumoto, Y., Ito, Y., Kitakaze, T., Inui, T., Murata, Y., Inui, H., & Yamaji, R. (2024). Mogrol stimulates G-protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1/TGR5) and insulin secretion from pancreatic β -cells and alleviates hyperglycemia in mice. *Scientific Reports*, 14(1), 3244. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53380-x>
- Tang, H., Kuang, Y., Wu, W., Peng, B., & Fu, Q. (2023). Quercetin inhibits the metabolism of arachidonic acid by inhibiting the activity of CYP3A4, thereby inhibiting the progression of breast cancer. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 29(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00720-8>
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(17), 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450–461. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
- Torres, A. M., Camargo, F. J., Ricciardi, G. A. L., Ricciardi, A. I. A., & Dellacassa, E. (2011). Neutralizing effects of Nectandra angustifolia extracts against Bothrops neuwiedi snake venom. *Natural Product Communications*, 6(9), 1393–1396. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600942>
- Torres, A. M., Ojeda, G. A., Angelina, E., Bustillo, S., Peruchena, N., Tonidandel, L., Larcher, R., Nardin, T., & Dellacassa, E. (2023). The anti-snake activity of Nectandra angustifolia flavonoids on phospholipase A2: In vitro and in silico evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115889>
- Truiti, M.D.C.T., Bersani-Amado, C.A., Dias Filho, B.P., Sarragiotto, M.H., De Souza, M.C. (2006). Screening of five Brazilian plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, 44, 516–521. <https://doi.org/10.1080/13880200600879005>
- Varatharaj, A., Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- van der Horst, D., Carter-Timofte, M. E., van Grevenynghe, J., Laguet, N., Dinkova-Kostova, A. T., & Olganier, D. (2022). Regulation of innate immunity by Nrf2. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 78). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102247>
- Vesely, M. D., & Schreiber, R. D. (2008). Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci.*, 42(2), 157–162. <https://doi.org/10.1037/a0030561>.Striving
- Vissenaekens, H., Grootaert, C., Rajkovic, A., De Schutter, K., Raes, K., Smagghe, G., Van de Wiele, T., & Van Camp, J. (2019). Cell line-dependent increase in cellular quercetin accumulation

- upon stress induced by valinomycin and lipopolysaccharide, but not by TNF- α . *Food Research International*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108596>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A. J., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
- Wang, X., Guo, D., Li, W., Zhang, Q., Jiang, Y., Wang, Q., Li, C., Qiu, Q., Wang, Y. (2020). Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) restricts MD2/TLR4-MyD88 complex formation and signalling in acute myocardial infarction-induced heart failure. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 24, 10677–10692. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15688>
- Wang, X., Khutsishvili, M., Fayvush, G., Tamanyan, K., Atha, D., & Borris, R. P. (2018). Phytochemical investigations of *Atraphaxis spinosa* L (Polygonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 77, 44–47. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.02.001>
- Wirth, T., Lafforgue, P., & Pham, T. (2024). NSAID: Current limits to prescription. *Joint Bone Spine*, 91(4), 105685. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2023.105685>
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1874–1905. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>
- Yang, B., Liu, H., Yang, J., Gupta, V. K., & Jiang, Y. (2018). New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science and Technology*, 79(March), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.006>
- Yang, M., Cui, M., Sun, Y., Liu, S., & Jiang, W. (2024). Mechanisms, combination therapy, and biomarkers in cancer immunotherapy resistance. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 22(1), 338. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01711-w>
- Yang, Q. qiao, Zhou, J. wei (2019). Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia* 67, 1017–1035. <https://doi.org/10.1002/glia.23571>
- Youn, I., Han, K. Y., Gurgul, A., Wu, Z., Lee, H., & Che, C. T. (2022). Chemical constituents of *Entandrophragma angolense* and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113276>
- Zamora-Martinez, M. C., & de Pascual Pola, C. N. (1992). Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(3), 229–257. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90021-l](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90021-l)
- Zhang, H., Hassan, Y. I., Liu, R., Mats, L., Yang, C., Liu, C., & Tsao, R. (2020). Molecular Mechanisms Underlying the Absorption of Aglycone and Glycosidic Flavonoids in a Caco-2 BBe1 Cell Model.

ACS Omega, 5(19), 10782–10793. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00379>

Zhu, K., Xia, Y., Tian, X., He, Y., Zhou, J., Han, R., Guo, H., Song, T., Chen, L., & Tian, X. (2023). Characterization and therapeutic perspectives of differentiation-inducing therapy in malignant tumors. *Frontiers in Genetics*, 14(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1271381>