

**BENEFICIOS DE UN EXTRACTO HIDRO-
ALCOHÓLICO DE *Achyrocline satureioides* LAM
(D.C.) (marcela) EN LA HIPERCOLESTEROLEMIA
Y EN EL ACCIDENTE CEREBRO-VASCULAR
EXPERIMENTAL.**

Tesis de grado en Licenciatura en Ciencias Biológicas.
Opción Neurociencias

2016

MATIAS STANCOV ITURRIOZ
ORIENTADORA: Dra. Felicia Rivera Megret
CO-ORIENTADOR: DR. Federico Dajas Méndez



ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA	5
2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA	5
2.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	7
2.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LOS ACCIDENTES CEREBRO-VASCULARES	8
2.5 FISIOPATOLOGÍA DE LOS ACV ISQUEMICOS	9
2.6 MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL	10
2.7 COMPUESTOS NATURALES COMO NEUROPROTECTORES	11
2.8 <i>Achyrocline satureioides</i> (marcela): SU POTENCIAL NEUROPROTECTOR.	11
2.9 ANTECEDENTES PARTICULARES	12
2.10 HIPÓTESIS	13
2.11 OBJETIVOS GENERALES	13
2.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Material biológico	14
3.2 Preparación del extracto hidro-alcohólico de AS	14
3.3 HIPERCOLESTEROLEMIA INDUCIDA A RATAS	14
3.3.1 Preparación del alimento enriquecido en colesterol	14
3.3.2 Animales y grupos experimentales	15
3.3.3 Procesamiento de la sangre	15
3.3.4 Análisis de los lípidos del suero sanguíneo	15
3.4 MODELO DE OCLUSIÓN PERMANENTE DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA EN RATAS	16

3.4.1 Animales y grupos experimentales	16
3.4.2 Oclusión permanente de la arteria cerebral media (OpACM)	16
3.4.3 Test funcional motor	17
3.4.4 Cuantificación del volumen del infarto cerebral.	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Consumo de alimentos, líquidos e incremento de peso	18
4.2 Deficiencias motoras	20
4.3 Porcentaje de infarto	20
4.4 COLESTEROL	21
4.4.1 Colesterol total	21
4.4.2 Triglicéridos	22
4.4.3 Colesterol LDL	22
4.4.4 Colesterol HDL	23
4.4.5 Índice Col HDL/Col no HDL	24
5. DISCUSIÓN	24
6. CONCLUSIONES GENERALES	28
7. PERSPECTIVAS	28
8. AGRADECIMIENTOS	29
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	30

RESUMEN

La hipercolesterolemia y el estrés oxidativo son eventos vinculados con la aparición de la arterosclerosis y la presencia de estas placas de ateromas en las arterias conlleva al desarrollo de patologías cardio y cerebro-vasculares, de elevada incidencia y prevalencia mundial. Reducir los niveles de lípidos y aumentar la capacidad antioxidante plasmática, son las estrategias terapéuticas más utilizadas. Por esa razón es que los productos naturales por su potente capacidad antioxidante están siendo ampliamente utilizados, en modelos de accidentes cerebro-vasculares isquémicos, como poseedores de potenciales beneficios frente a la hipercolesterolemia.

Achyrocline satureioides (AS) (marcela) es una planta que ha sido ampliamente utilizada en la medicina popular suramericana y estudios experimentales confirman sus efectos antioxidantes y neuroprotectores, atribuibles a la presencia de flavonoides como la quercetina y luteolina, descritos también como capaces de disminuir la absorción del colesterol en modelos *in vivo* e *in vitro*.

En esta tesis proponemos que un extracto hidro-alcohólico de *Achyrocline satureioides* (AS) (Marcela) puede tener efectos beneficiosos en los valores del perfil lipídico de ratas sometidas a una dieta hipercolesterolémica y tratadas con el extracto. Además podría confirmar si este preparado hidro-alcohólico al igual que otros preparados de AS protege el tejido cerebral de ratas sometidas a la oclusión permanente de la arteria cerebral media y aminorar además las deficiencias motoras que provoca la isquemia en los animales estudiados.

Ratas Sprague Dawley machos de entre 280-350 g fueron divididas en 5 grupos (n = 5 c/u): (Grupo 1: Colesterol 10 g/Kg + agua); (Grupo 2: Colesterol 10g/kg + marcela); (Grupo 3: Control agua); (Grupo 4: Control marcela); (Grupo 5: Control alcohol) y administradas durante 5 semanas con el extracto de marcela. El control del peso corporal de los animales fue registrado semanalmente y diariamente el consumo de agua, Marcela y alimento. Se realizó la administración oral a ratas (en mamaderas) del extracto en dosis de 3 mg/ml Quercetina/día (cuantificada por *High performance liquid chromatography* (HPLC)). Posteriormente los animales fueron anestesiados, se extrajo sangre del ventrículo izquierdo, y las muestras fueron colocadas en tubos secos con la finalidad de obtener el suero, el cual fue utilizado en el análisis del perfil lipídico.

Para el estudio de la capacidad neuroprotectora del extracto frente a la oclusión de la arteria cerebral media, se utilizó la misma línea de ratas. El consumo de alimentos y agua y/o extracto fue cuantificado diariamente y la ganancia de peso semanal. El daño al tejido cerebral fue evaluado con una sal de tetrazolio y se realizó un test de comportamiento sensoro-motor

previo al sacrificio.

Después de la administración oral durante 5 semanas del extracto de marcela a ratas sometidas a una dieta hipercolesterolémica, se observaron efectos beneficiosos en el perfil lipídico de los animales luego del tratamiento, reduciendo aunque no de forma estadísticamente significativa, los valores de colesterol, triglicéridos y colesterol LDL. Los resultados obtenidos en el presente estudio también confirman la capacidad neuroprotectora del preparado cuando se administra a ratas en un diseño pre-clínico durante 7, 14 y 21 días previos a la opACM durante 24 horas. El decrecimiento en la extensión de la lesión demostrada mediante la sal de tetrazolio y la recuperación en el comportamiento motor, son claras evidencias del efecto protector del preparado de AS.

Estos resultados pueden considerarse evidencias preliminares para continuar con el estudio de este preparado de As y en un futuro proponerlo como coadyuvante para los tratamientos clásicos utilizados en este proceso de hipercolesterolemia, como son las estatinas y también en la Fitomedicina, disciplina de gran auge en estos momentos. En la literatura científica internacional existen evidencias del papel que juegan los productos naturales, en especial los flavonoides en el mecanismo de acción de la síntesis del colesterol, por su papel como antioxidantes y también anti-hipercolesterolémicos.

INTRODUCCIÓN

La hipercolesterolemia y el estrés oxidativo son eventos vinculados con la aparición de la arterosclerosis y la presencia de estas placas de ateromas en las arterias conlleva al desarrollo de patologías cardio y cerebro-vasculares, de elevada incidencia y prevalencia mundial. Reducir los niveles de lípidos y aumentar la capacidad antioxidante plasmática, son las estrategias terapéuticas más utilizadas¹. Por esa razón es que los productos naturales por su potente capacidad antioxidante están siendo ampliamente utilizados, en modelos de accidentes cerebro-vasculares isquémicos², como poseedores de potenciales beneficios frente a la hipercolesterolemia^{3,4,5}.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA

La aterosclerosis es el proceso patológico común que subyace a las enfermedades cardiovasculares. Varios factores de riesgo como el estrés oxidativo⁶, disfunciones en los lípidos⁷ e inflamación crónica⁸ han sido correlacionados con el desarrollo de la aterosclerosis y de las enfermedades cardiovasculares subsecuentes. A nivel mundial el aumento en los niveles de colesterol se estima como el causante del 56% de las enfermedades cardíacas isquémicas y el 18% de los infartos, alcanzando las 4.4 millones de muertes anuales.

Se estima que solo en los Estados Unidos, más de 33 millones de adultos mayores de 20 años poseen niveles de colesterol total en suero mayores a 250 mg/dL, con una prevalencia del 15%⁹ y también Austin et al., (2000) demostraron una relación directa entre los niveles de colesterol y triglicéridos y la mortalidad cardiovascular¹⁰. Otros estudios han confirmado que un nivel elevado de Colesterol-Lipoproteínas de baja densidad (CT-LDL) es predictor de un infarto cerebro-vascular isquémico¹¹, mientras que el nivel de Colesterol – Lipoproteínas de alta densidad (colesterol-HDL) no lo es. Se ha sugerido que estas diferencias se deben a la heterogeneidad en la patogénesis del infarto isquémico. Así, algunos sub-tipos de infarto cerebro-vascular estarían más relacionados con la hipercolesterolemia¹².

FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA

El colesterol, tanto como componente de las membranas biológicas como precursor de la vitamina D, ácidos biliares y hormonas esteroideas es un componente nutricionalmente esencial. Sin embargo, su consumo en exceso afecta la homeostasis, dañando las paredes internas de los vasos sanguíneos, lo cual interfiere con la circulación y puede dar lugar a varias patologías como infarto cardíaco y cerebral¹³.

En humanos, la homeostasis del colesterol se encuentra principalmente balanceada por la absorción intestinal, biogénesis endógena y excreción biliar/intestinal¹⁴. El consumo excesivo de colesterol en la dieta es uno de los mayores factores de riesgo para la hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares, especialmente aterosclerosis. La aterosclerosis consiste en el desarrollo de lesiones vasculares o de placas en los vasos sanguíneos, seguido de un proceso oxidativo/inflamatorio en respuesta al daño endotelial¹⁵. Dichas placas se componen principalmente de células sanguíneas, células “espumosas”, lípidos y proteínas con acumulación de calcio¹⁶. Esto da como resultado la reducción y bloqueo del diámetro vascular con la subsecuente reducción del flujo sanguíneo, proceso que favorece la ruptura de las paredes de los vasos¹⁷. (Figura 2).

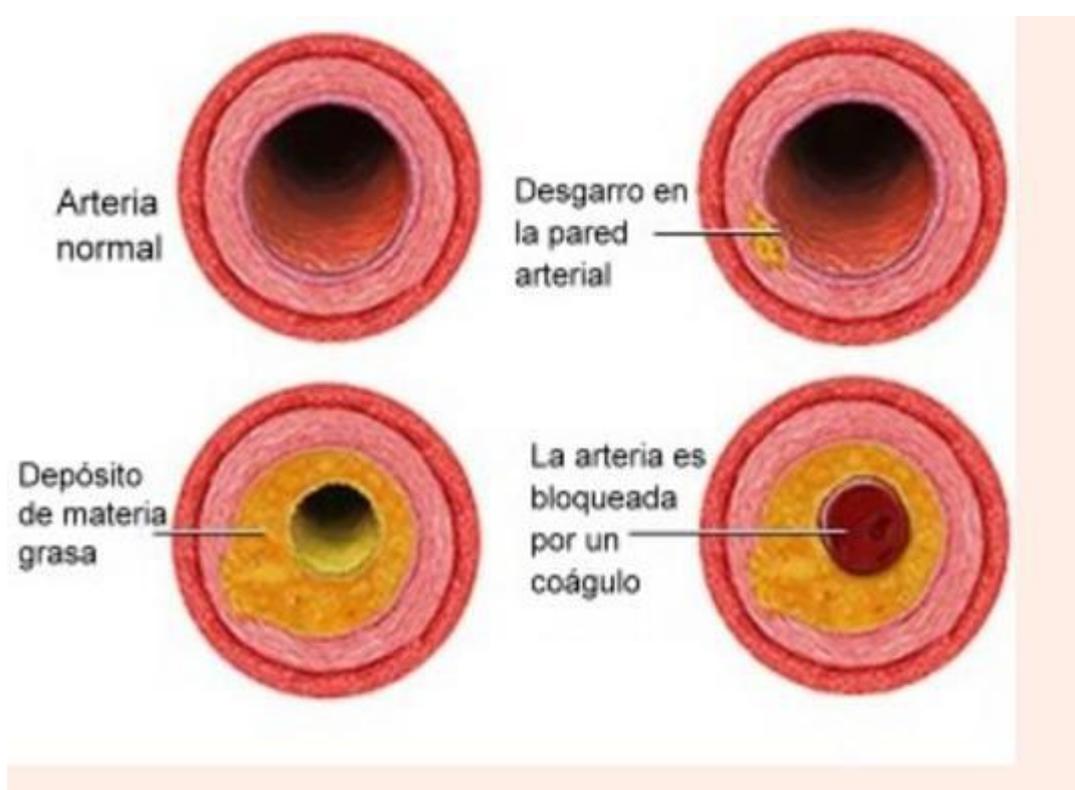


Figura 1: Se representa la formación de las placas de ateroma y el proceso de obstrucción vascular que causan, dificultando la circulación sanguínea y deteriorando la pared vascular.

La hipercolesterolemia se caracteriza por elevados niveles en suero de CT (Colesterol total). Sus niveles fisiológicos son de 250 mg/dl, a partir del cual conlleva un riesgo cardiovascular. La unión del colesterol a las proteínas, hace que se distingan 2 tipos de colesterol: el denominado comúnmente malo LDL (Lipoproteínas de baja densidad) que se forman a partir de las VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad). Estas LDL poseen una elevada concentración de colesterol y fosfolípidos y obstruyen las arterias formando las placas

de ateromas¹³. Diversos estudios han referido que las LDL son los lípidos más dañinos y su oxidación resulta en un incremento en su penetración en las paredes arteriales, dando lugar a la formación de las lesiones de las placas de ateromas¹⁸.

Por otro lado el colesterol HDL (Lipoproteínas de alta densidad), denominado comúnmente bueno, que barre el exceso de las LDL limpiando de esa forma las arterias. Las HDL contienen una elevada concentración de proteínas y baja de colesterol y fosfolípidos por lo que depuran parcialmente el colesterol de los tejidos periférico transportándolo al hígado para su eliminación¹³ (Figura 3).

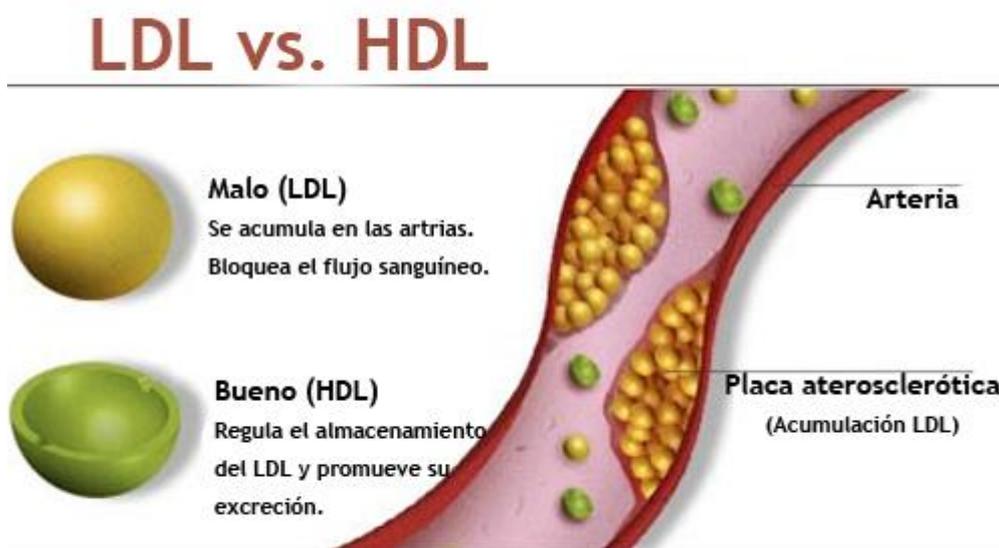


Figura 2: LDL y HDL

El incremento en las LDL, formadas a partir de las VLDL y el elevado consumo dietario de lípidos, provoca que éstas se adhieran a la pared de los vasos sanguíneos con las consecuencias vasculares ya descritas, las que pueden prevenirse mejorando la dieta¹⁹. La hipercolesterolemia, así como la hipertensión, obesidad, sedentarismo, tabaquismo y la diabetes, son factores de riesgos para los accidentes cerebrovasculares⁴.

ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Se define el estrés oxidativo (EO) como el desbalance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes celulares. La producción de radicales libres a partir de las mitocondrias que ocurre a lo largo de la vida, si ocurre un desbalance con relación a las

defensas antioxidantes, causa daños a las membranas celulares, proteínas y cadenas de ADN y estos daños son acumulados durante toda la vida²⁰. Esta inevitable exposición a un ambiente celular altamente oxidativo, además de ser responsable del proceso de envejecimiento, también lo es para varias patologías asociadas a este proceso, las cuales presentan una elevada prevalencia e incidencia en países industrializados²¹. Entre estas patologías, las más conocidas son la demencia senil, el Parkinson, así como patologías a nivel cardio y cerebrovasculares^{22,4}.

EPIDEMIOLOGÍA DE LOS ACCIDENTES CEREBRO-VASCULARES

Los Accidentes Cerebro Vasculares (ACV) causan 5 millones de muertes anuales en todo el mundo²³ con un elevado costo para los sistemas de salud²⁴. Consisten en un cambio repentino en la circulación sanguínea, que resulta en una disminución del suministro de sangre al cerebro.

El ACV puede ser del tipo hemorrágico o isquémico, siendo el isquémico el resultado de una reducción permanente o transitoria en el flujo sanguíneo de un vaso cerebral de gran calibre y ocurre aproximadamente en el 80% de los casos de todos los ACV²⁵.

Se estima que un porcentaje elevado de los ACV ocurren por la oclusión transitoria o permanente de la Arteria Cerebral Media²⁶. Ante la oclusión de esta arteria, aproximadamente el 50% del riego sanguíneo cerebral disminuye y las principales áreas afectadas son la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado. La falta de flujo sanguíneo en dichas zonas está asociada con un déficit tanto motor como cognitivo²⁷. En Uruguay no existen datos epidemiológicos recientes que permitan conocer la incidencia y prevalencia de esta patología, pero un estudio realizado en 1997 reflejó que existía una elevada tasa de prevalencia de ACV, que se correspondía con datos de mortalidad cerebrovascular elevadas comparadas con otros países²⁸. Recientemente hemos podido recopilar datos que describen que la Incidencia anual de ACV en pacientes mayores a 60 años es de alrededor de 150 a 180 por 100.000 habitantes por año con 5000 casos de mayores de 60 años afectados por un ACV. De estos 5000 casos el 25% muere y el 75% restante presentan discapacidades y secuelas. Se ha informado que en Uruguay para 2020 se cuadruplicará la aparición de los ACV, debido al elevado número de personas envejecidas (Comunicación personal: Dr. Kaplan. Grupo Nacional de ACV. Ministerio de Salud Pública).

FISIOPATOLOGÍA DE LOS ACV ISQUEMICOS

El EO es una vía final común de todos los procesos moleculares que ocurren durante un ACV y constituye un daño potencial para la viabilidad celular. El EO que da lugar a la muerte celular en la isquemia, involucra la formación de radicales libres a través de múltiples mecanismos, tales como la disfunción mitocondrial, defectos en la conductancia al Ca^{2+} , daños por re-oxigenación, así como la producción de mediadores inflamatorios²⁹.



Figura 3: Fisiopatología de los Accidentes Cerebrovasculares.

Cada uno de estos procesos fisiopatológicos poseen distintos marcos temporales, algunos ocurren en el lapso de minutos y otros en horas o hasta días. Varios de estos procesos se superponen en tiempo y poseen características comunes, causando daños en neuronas, glías y células endoteliales. En tal sentido, podemos distinguir 2 zonas de la lesión isquémica: el núcleo, donde el flujo sanguíneo es altamente restringido, aquí los procesos de excitotoxicidad y muerte celular por necrosis ocurren en minutos y en la periferia del núcleo isquémico, donde

el flujo sanguíneo proveniente del lado contralateral (Círculo de Willis) puede mantener la población neuronal parcialmente metabólicamente activas durante un tiempo y esto puede amortiguar el nivel del daño provocado por la isquemia. Esta zona es denominada “penumbra” isquémica y puede variar su volumen dependiendo del grado de la isquemia y el tiempo de reperusión. La zona de penumbra es el principal objetivo terapéutico y el blanco de acción de los agentes neuroprotectores³⁰.

La hipertensión, la obesidad, el sedentarismo, la hiper-colesterolemia, el tabaquismo, la diabetes, son factores de riesgos para esta patología. La amplia aparición en la sociedad de estas conductas y patologías explica la incidencia que tiene el ACV en el mundo. Contradictoriamente las terapias neuroprotectoras frente a los ACV son escasas e insuficientes ya que hasta el presente el *thrombolytic tissue plasminogen activator* (tPA) es la única terapia aguda aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento agudo de estas patologías³¹. Es por estas razones que muchos laboratorios en el mundo, están centrando sus investigaciones en encontrar terapias efectivas para neutralizar los daños neurológicos provocados por los ACV³⁰. Entre las terapias descritas para prevenir los ACV las sugeridas con mayor frecuencia incluyen: dietas saludables rica en vitaminas y otros antioxidantes, ejercicio físico, y reducción del estrés³¹. Para nuestro grupo de trabajo también ha sido de interés explorar terapias naturales de prevención de los ACV, teniendo en cuenta la situación epidemiológica del país en cuanto a esta patología.

MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

Para comprender los mecanismos implicados en el daño al tejido nervioso que ocurre durante los procesos isquémicos y también la eficiencia de las terapias neuroprotectoras es imprescindible el uso de modelos animales de los cuales se han descrito dos tipos principales: globales y focales³³. Los modelos de isquemia focal son reconocidos como los más adecuados, cuando se pretende estudiar las isquemias humanas³⁴ e involucra la oclusión temporal o permanente de la Arteria Cerebral Media (ACM)³⁵. La oclusión de esta arteria provoca en las ratas evidentes deficiencias, tales como dificultades en la coordinación de los movimientos y en algunos reflejos sensoriales³⁶, parámetros que pueden ser cuantificados mediante la aplicación de modelos de comportamiento motor/sensorial que permiten caracterizar la lesión cerebral y además evaluar las mejoras logradas en la aplicación de terapias neuroprotectoras³⁷.

COMPUESTOS NATURALES COMO NEUROPROTECTORES

Muchos compuestos naturales han mostrado una relación inversa con determinados marcadores de estrés celular. Los polifenoles presentes en las plantas, y dentro de este grupo, principalmente los flavonoides, juegan un rol importante en esta relación. Evidencias experimentales demuestran que la quercetina, un flavonoide ampliamente distribuido en la naturaleza, ha mostrado capacidad antioxidante, anti-inflamatoria, neuromoduladora y neuroprotectora en diversos modelos experimentales³⁸ *in vitro*³⁹ e *in vivo*, por ejemplo cuando un preparado liposomal de este flavonoide logró disminuir el volumen del infarto cerebral en un modelo de oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media (opACM)^{40,41}.

***Achyrocline satureioides* (marcela): SU POTENCIAL NEUROPROTECTOR.**

AS es una planta de uso popular en Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay y sus decocciones e infusiones han sido tradicionalmente utilizadas por la población de Uruguay para desórdenes gastro-intestinales, como regulador menstrual y por sus efectos sedantes y antiespasmódicos⁴². Se ha demostrado experimentalmente que AS es un potente antioxidante y *scavenger* de radicales libres⁴³, teniendo además actividad antiherpética, analgésica, antitumoral, citotóxica, digestiva, hipoglicémica, inmunomoduladora, sedante y relajante muscular⁴⁴. El potencial anti-inflamatorio de AS ha sido descrito en diversos estudios experimentales⁴⁴. También Cosentino y cols., (2008) demostraron que una infusión de esta planta logró inhibir la proliferación y producción de citoquinas pro-inflamatorias en leucocitos de sangre humana periférica⁴⁵. Estos efectos beneficiosos descritos para AS han sido justificados por su alto contenido en flavonoles como la quercetina y luteolina^{44,46}.



Figura 4: *Achyrocline satureioides* (marcela).

ANTECEDENTES PARTICULARES

En el departamento de Neuroquímica del Instituto Clemente Estable se trabaja desde hace varios años en la búsqueda de compuestos naturales capaces de brindar neuroprotección frente al ACV isquémico experimental, utilizando preparaciones de AS. En nuestro departamento se describió por primera vez su efecto fotoprotector⁴⁷ y su capacidad citoprotectora frente al daño oxidativo de células PC12 en cultivo⁴⁸. También se confirmó que el extracto acuoso de AS no es tóxico en una dosis máxima tolerada de 5 gr/Kg⁴⁹. Datos obtenidos en nuestro departamento demuestran que un pre-tratamiento oral crónico durante 7, 14 y 21 días con una decocción de AS (2%), disminuyó las deficiencias funcionales motoras causadas a los animales por la opACM y también disminuyó significativamente el volumen del infarto cerebral cuando el pre-tratamiento con AS fue de 21 días².

En nuestros estudios anteriores obtuvimos confirmación de los beneficios preventivos neuroprotectores de una decocción de AS² y en otro estudio aislamos de esta decocción una fracción enriquecida con los flavonoles constitutivos de AS (quercetina, luteolina y 3-O-metilquercetina) (Fracción Neutra) (FN), y confirmamos que pudo disminuir el tamaño del infarto cerebral en un pre-tratamiento oral a ratas en 14 días, demostrando la eficacia del preparado de flavonoides para lograr la protección del tejido cerebral en menos tiempo (Tesis de Grado del Lic. Vicente Ruiz).

Estudios experimentales recientes demuestran que el consumo de polifenoles está correlacionado con el decrecimiento en el riesgo de aterosclerosis, debido a sus efectos antioxidantes. En tal sentido Nekohashi cols (2014) demostraron que los flavonoides disminuyen el transporte intestinal de colesterol. Los autores determinaron los parámetros cinéticos de la absorción intestinal del colesterol en modelos *in vitro* e *in vivo*.

En esta investigación se plantea que el Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) es un transportador epitelial del colesterol y la Ezetimibe, es un potente inhibidor de este transportador utilizado en la medicación de la hipercolesterolemia.

Los autores demuestran que la pre-incubación de la línea celular Caco 2 con quercetina y luteolina (flavonoides constitutivos de la marcela) disminuye la absorción de colesterol en esas células. También los niveles de colesterol en el suero de las ratas alimentadas con quercetina y

luteolina disminuyeron significativamente comparados con los animales tratados solamente con colesterol. Los niveles de inhibición y los efectos irreversibles de estos flavonoides fueron similares a los obtenidos con la Ezetimibe⁵⁰.

Con el objetivo de dilucidar si los flavonoides contenidos en nuestra preparación de marcela pueden tener alguna influencia en el metabolismo de colesterol y también en la reducción del infarto cerebral experimental, en esta tesis nos propusimos la siguiente:

HIPÓTESIS: Un pre-tratamiento con un extracto hidro-alcohólico de AS puede producir modificaciones beneficiosas en el perfil lipídico de animales sometidos a una dieta hipercolesterolémica y además disminuir las deficiencias motoras y el daño al tejido cerebral causado por la oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratas.

OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Estudiar el perfil lipídico del suero de ratas tratadas con una dieta hipercolesterolémica y con el extracto hidro-alcohólico de As.
- 2.- Cuantificar los efectos del extracto hidro-alcohólico de AS sobre las deficiencias motoras de animales sometidos a isquemia focal permanente durante 24 horas.
- 3.- Confirmar si las acciones neuroprotectoras en el accidente cerebro-vascular isquémico, ya demostradas en otros preparados de marcela, se mantienen en este extracto hidro-alcohólico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Administrar ó no (en el caso de los controles) durante 5 semanas a los animales de los diferentes grupos experimentales con una dieta rica en colesterol y con el extracto hidro-alcohólico de As.
- 2.- Controlar el incremento de peso semanal, el consumo de alimento y del extracto y/o agua (controles) diariamente de todos los animales en estudio.
- 3.- Cuantificar el perfil lipídico en el suero de todos los animales experimentales.
4. Administrar por la vía oral el extracto hidro-alcohólico de AS durante 7, 14 y 21 días a los animales de diferentes grupos experimentales. Posteriormente serán sometidos por personal especializado (en este caso la tutora de esta tesis Dra. Felicia Rivera) a la opACM durante 24 horas.
- 5- Controlar el incremento de peso semanal y el consumo de alimento, del extracto y/o agua (controles) diariamente de todos los animales en estudio.
- 6.- Evaluar las habilidades motoras de los animales transcurridas 24 horas de la opACM, utilizando un estudio comportamental.

7.- Cuantificar el volumen del infarto cerebral, utilizando una sal de tetrazolio y un sistema de imágenes computarizado.

MATERIALES Y METODOS

-Material biológico

Las flores secas de AS fueron obtenidas del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), “Las Brujas”, Canelones, Uruguay. La identificación taxonómica de estas muestras fue realizada por el Ing. Agr. P. Davies y un voucher de AS se mantiene en la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, Uruguay (MVFA 32796).

-Preparación del extracto hidro-alcohólico de AS

- 1– Se colocan 3.5 Kg de marcela en el vaso del equipo soxhlet de capacidad 100 L.
- 2– Se agregan 70 L de EtOH (95°gl).
- 3– Se deja macerar por un día.
- 4– Se descarga el EtOH al boiler y se comienza el calentamiento y la evaporación de alcohol que condensa y cae al vaso del equipo donde se encuentra la marcela.
- 5– Cuando el nivel de EtOH condensado alcanza el nivel de sifonamiento vuelve al boiler.
- 6– Los procesos 4 y 5 se repiten 4 veces.
- 7– Luego del paso 6, se saca la marcela utilizada y se agregan otros 3.5 Kg de marcela. Se agrega EtOH para cubrir toda la planta. Repitiéndose el procedimiento, hasta obtener una concentración de extracto de marcela de 3 mg de quercetina /mL de extracto (cuantificada por HPLC). Lo que normalmente se alcanza luego de realizar el proceso 3 veces.

HIPERCOLESTEROLEMIA INDUCIDA A RATAS

-Preparación del alimento enriquecido en colesterol

El alimento utilizado en el estudio contiene: Harina de carne bovina, gluten de maíz, trigo, maíz, afrechillo de arroz, subproductos de arroz, y núcleo vitamínico mineral (Nutrivit registro Nº 6550) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). A 30 kg de comida, se le añade 1 Kg 800 gr de colesterol, proporción que permitió obtener la dosis de colesterol de 10 gr/Kg de peso de las ratas. El proceso de preparación y mezclado de ración

con colesterol estuvo a cargo del Dr. Vet. Melchor Pacheco Alvarez de la empresa ELITY S.A. La forma terminada (pelletizado) para que pueda ser aceptado el alimento por roedores, fue realizada en la empresa Montevi S.A. El proceso consiste en mezclar agua y el preparado con colesterol en una amasadora industrial hasta formar una masa compacta. Los pellet se elaboran utilizando una máquina que permite darle la forma adecuada y son horneados durante 40 minutos y listos para ser utilizados.

-Animales y grupos experimentales

Se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley de entre 280-350 g. Los animales fueron mantenidos en grupos de a 5 en un cuarto a temperatura controlada (22 ± 3 °C) y bajo condiciones de luz/oscuridad de 12 horas. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Clemente Estable. El control del peso corporal de los animales fue registrado semanalmente y el consumo de agua/Marcela y alimento diariamente. Se realizó la administración oral a ratas (en mamaderas) del extracto hidroalcohólico de As, en dosis de 3 mg/ml Quercetina/día (cuantificado por HPLC). Se administró durante 5 semanas a los animales pertenecientes a los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1: Colesterol 10 + agua (n=5)

Grupo 2: Colesterol 10 + marcela (n=5)

Grupo 3: Control agua (n=5)

Grupo 4: Control marcela (n=5)

Grupo 5: Control alcohol (n=5)

Procesamiento de la sangre

Después de 5 semanas de tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (80 mg/kg) y Xylasina (5 mg/kg) y se extrajo sangre del ventrículo izquierdo. Inmediatamente las muestras de sangre fueron colocadas en tubos secos con la finalidad de obtener el suero, el cual fue utilizado en el análisis del perfil lipídico.

Análisis de los lípidos del suero sanguíneo

Las concentraciones en suero de Colesterol Total (CT), triglicéridos, Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL), Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) e índice Colesterol HDL/Colesterol no HDL (Col HDL/Col no HDL) fueron medidas en un “estudio ciego” utilizando un kit

comercial. Este estudio fue realizado en el Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República y fueron validados por la Prof. Agda. Dra. Alicia Olascoaga, jefa del referido laboratorio.

MODELO DE OCLUSIÓN PERMANENTE DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA EN RATAS

-Animales, grupos y protocolo experimental

Los animales tuvieron acceso al alimento y agua “ad libitum” y fueron mantenidos en grupos de 6 en un ambiente a temperatura controlada ($22 \pm 3^{\circ}$ C) y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Clemente Estable: Protocolo No. 002/5/2010.

Se utilizaron 25 ratas Sprague-Dawley de entre 280-350 (g), distribuidas en 5 grupos:

Grupo 1: Sham, (tratado con agua corriente) (n=5)

Grupo 2: Isquémico, (sometido a la opACM durante 24 horas (n=5)

Grupos 3 – 4 - 5: (Pre-tratados con el extracto durante 7, 14 y 21 días respectivamente y posteriormente sometidos a la opACM durante 24 horas) (n=5/ grupo).

-Oclusión permanente de la arteria cerebral media (OpACM)

La opACM fue inducida utilizando el método de introducción de un filamento intraluminal⁵¹. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (80 mg/kg) y Xylasina (5 mg/kg), se realizó una incisión media en el cuello de los animales y se expusieron la arteria carótida común (ACC), la arteria carótida externa (ACE) y la arteria carótida interna (ACI) del lado izquierdo. La ACC y la ACE fueron ligadas y la ACI fue ocluida con un clip. Posteriormente se realizó una pequeña incisión en la ACC y se insertó un filamento de 19 mm de longitud de un hilo de sutura de nylon, deslizándolo por la ACI hasta ocluir el origen de la ACM. La herida fue suturada y los animales fueron devueltos a sus jaulas, donde permanecieron por 24 horas hasta el desarrollo del test motor y el posterior sacrificio de los mismos con el propósito de estudiar el tamaño de la lesión isquémica. La cirugía estuvo a cargo de la Dra. Felicia Rivera.

Procedimiento quirúrgico para la oclusión de la arteria cerebral media

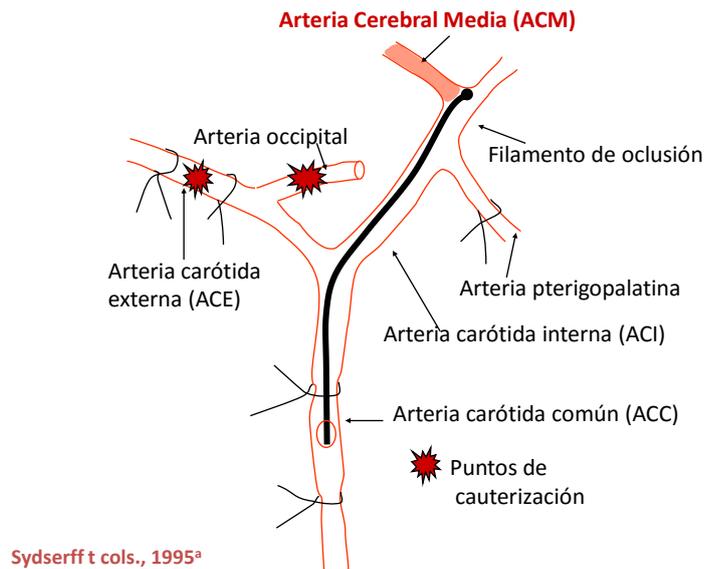


Figura 5: Modelo de Oclusión Permanente de la Arteria Cerebral Media.

-Test funcional motor.

Veinticuatro horas después de la opACM los animales de todos los grupos experimentales fueron sometidos a un examen neurológico³⁷. En la observación del comportamiento de los animales, se les asignó un puntaje de acuerdo a las siguientes disfunciones motoras: 0 (sin deficiencias aparentes); 1 (mantiene flexionado el miembro contralateral a la lesión isquémica mientras se le suspende por la cola); 2 (disminución de la fuerza de agarre del miembro contralateral mientras se le mantiene suspendido por la cola); 3 (realiza movimientos espontáneos en todas direcciones y círculos contralaterales si se le mantiene suspendido por la cola); y 4 (realiza movimientos en círculos contralaterales). Este test fue realizado “a ciegas” sin conocer el grupo experimental al que pertenece cada animal.

-Cuantificación del volumen del infarto cerebral.

Al finalizar la prueba funcional motora los animales de todos los grupos experimentales fueron anestesiados con Uretano (2.4 gr/Kg) y perfundidos por la vía transcardíaca con solución salina (ClNa 0.9%)⁵². Los cerebros fueron disecados y se realizaron 4 cortes coronales (de 2.20, 1.20, 0.20 y -0.26 con respecto a Bregma⁵³). Las secciones de cerebro se sumergieron en una solución de 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) durante 30 minutos a 37⁰C y después en formol al 10% durante 1 hora⁴³. Fueron fotografiadas y sobre esas imágenes se

delinearon tanto la zona de infarto, como el área total del cerebro⁴⁹. Estas áreas fueron medidas utilizando un programa procesador de imágenes computarizado (Image Pro-Plus). A partir de las áreas se calculó el porcentaje de infarto total del cerebro.

RESULTADOS

Consumo de alimentos, líquidos e incremento de peso

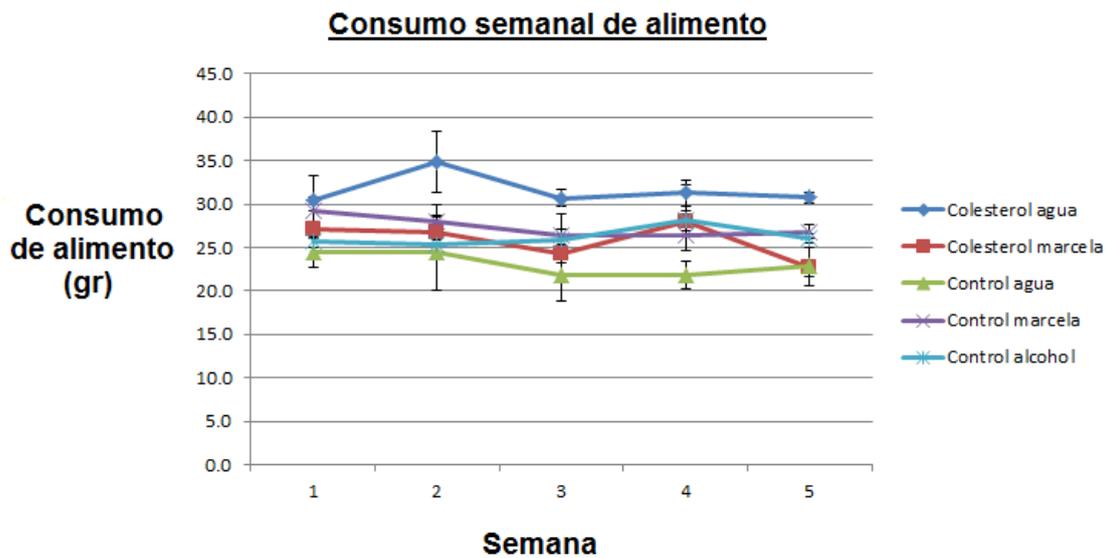


Figura 6: Se muestra el consumo semanal de alimentos. Los datos representan las medias \pm DS. Para $P < 0.05$

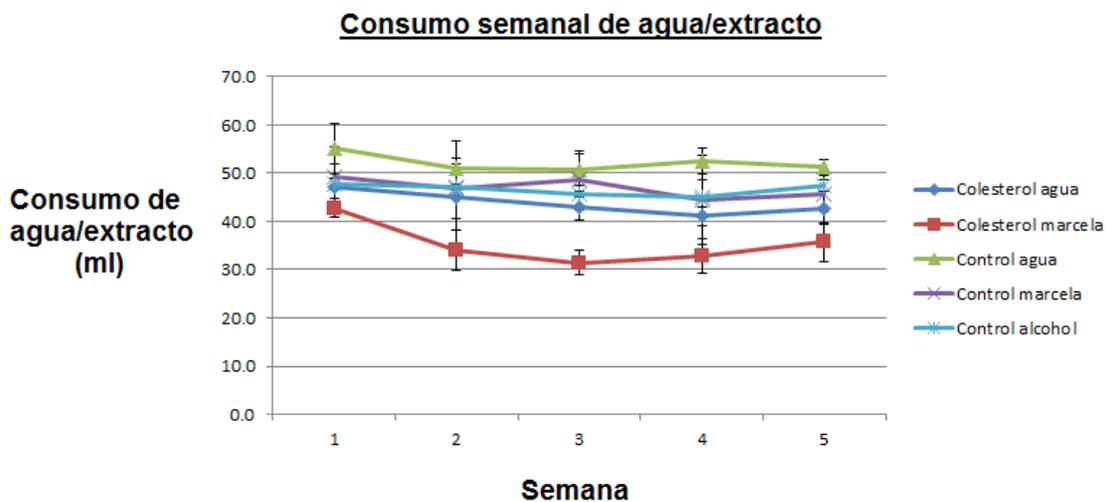


Figura 7: Se muestra el consumo semanal de agua, extracto y alcohol 2.1%. Los datos representan las medias \pm DS. Para $P < 0.05$

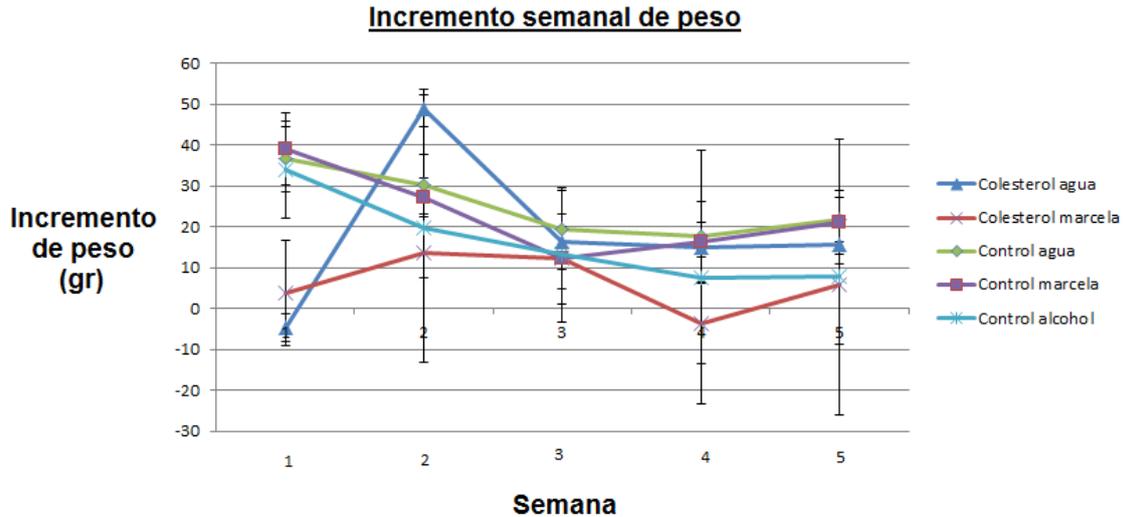


Figura 8: Se representan los valores numéricos del incremento semanal de peso. Los datos representan las medias \pm DS.

	Colesterol agua		Colesterol marcela		Control agua		Control marcela		Control alcohol	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Alimento	32	2.61	26 (**)	2.94	27 (**)	2.91	23 (***)	2.1	26 (**)	1.39
Líquidos	44	4.56	35 (**)	5.12	52 (**)	4.21	47	6.59	47	2.03
Peso	91	8.52	18 (***)	4.43	126	21.06	116	13.89	88	29.65

Tabla 1: Consumo e incremento promedio para cada grupo. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por One Way analysis of variance (ANOVA) seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

Todos los animales pertenecientes a los grupos controles mostraron un comportamiento similar durante las 5 semanas de tratamiento. En los grupos sometidos a la dieta hipercolesterolémica se observó que el grupo pre tratado con agua mostró un mayor consumo de alimentos.

También observamos diferencias en el consumo de líquidos, haciéndose evidente que los grupos de animales sometidos a cambios en su dieta habitual tuvieron un menor consumo de líquidos en comparación al grupo control tratado con su dieta habitual. El grupo que consumió la dieta hipercolesterolémica y fue tratado con marcela, mostró una disminución significativa en el incremento de peso.

1. Deficiencias motoras

Previo a la opACM, todos los grupos experimentales presentaron una puntuación equivalente a 0, reflejando ausencia de afecciones previas al procedimiento quirúrgico. Veinticuatro horas después y previo al sacrificio, los animales sometidos a la opACM demostraron notorias deficiencias motoras y dificultades en realizar las distintas pruebas que implica el test. Los animales pre-tratados con el extracto durante 7, 14 y 21 días mostraron una reducción en las deficiencias motoras causadas por la isquemia, aunque los datos no fueron suficientes para mostrar diferencias estadísticamente significativas. En los animales pre-tratados durante 21 días, la reducción de deficiencias motoras fue menor que para los grupos pre-tratados durante 7 y 14 días.

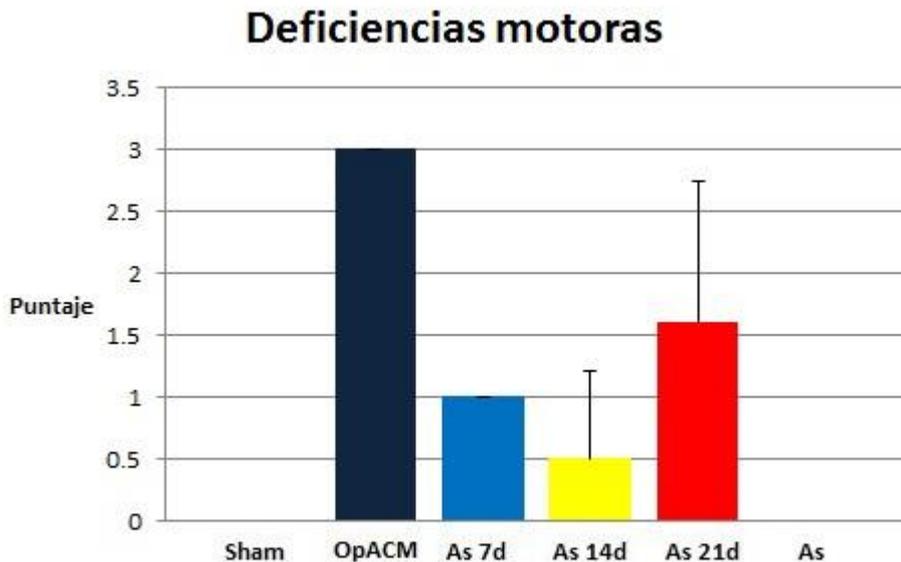


Figura 9: Puntaje asignado en el test neurológico para el grupo isquémico (OpACM) y los pre-tratados con el extracto de AS durante 7, 14 y 21 días respectivamente. Los datos representan las medias \pm DS. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANOVA seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

2. Porcentaje de infarto

Los grupos Sham y tratados con AS no mostraron ningún signo de lesión en el tejido cerebral, reflejando la ausencia de daño previo al procedimiento quirúrgico. Los grupos pre-tratados con el extracto durante 7, 14 y 21 días mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo sometido a la OpACM sin pre-tratar, mostrando una reducción del tamaño del infarto de 91, 90 y 72% respectivamente. Cabe destacar que, si bien todos los grupos mostraron una reducción significativa del infarto, esta fue menor en el grupo pre-tratado durante 21 días.

Cuantificación del área de infarto (%)

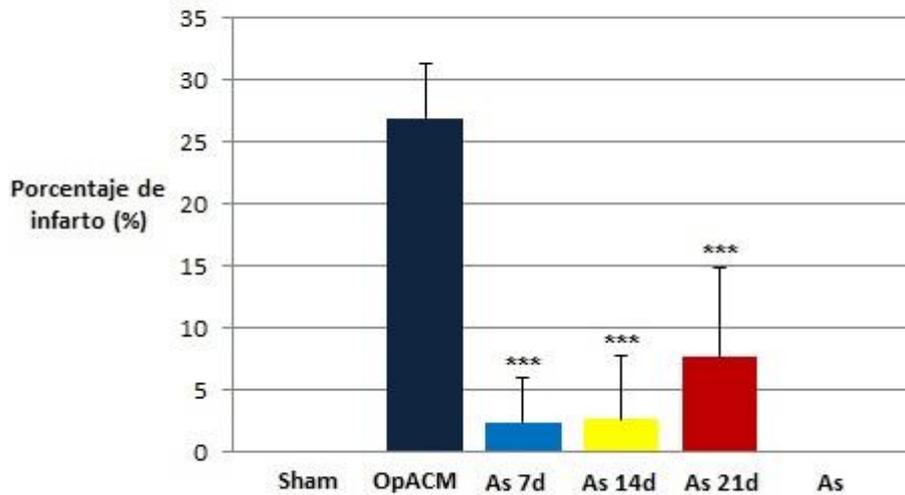


Figura 10: Porcentaje de tejido infartado 24 horas después de someterse a la OpACM. Los datos representan las medias \pm DS. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANOVA seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

Colesterol:

1. Colesterol total

Se observa un decrecimiento en los niveles de colesterol total para todos los grupos comparados con el grupo control hipercolesterolémico, aunque solo se observó diferencia significativa en los 3 grupos control alimentados con comida sin colesterol agregado. La diferencia fue mayor para los grupos tratados con el extracto y con el control de alcohol.

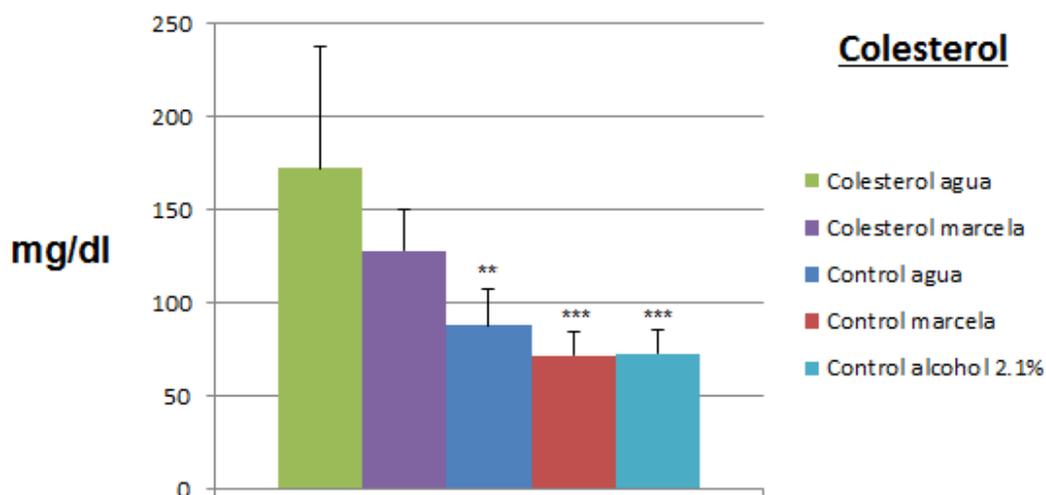


Figura 11: Nivel de colesterol en suero sanguíneo. Los datos representan las medias \pm DS. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANOVA seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

2. Triglicéridos

Se observa un decrecimiento en los niveles de triglicéridos en los grupos de colesterol y marcela y en el control de alcohol, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

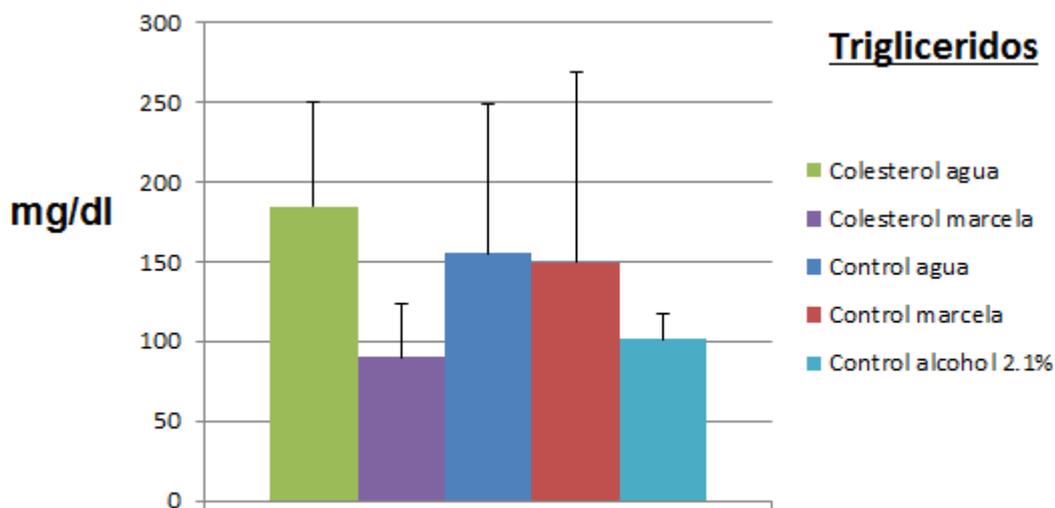


Figura 12: Nivel de triglicéridos en suero sanguíneo. Los datos representan las medias \pm DS. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANOVA seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

3. Colesterol LDL

Se observó una disminución significativa en los niveles de colesterol LDL para los grupos de control marcela y control alcohol.

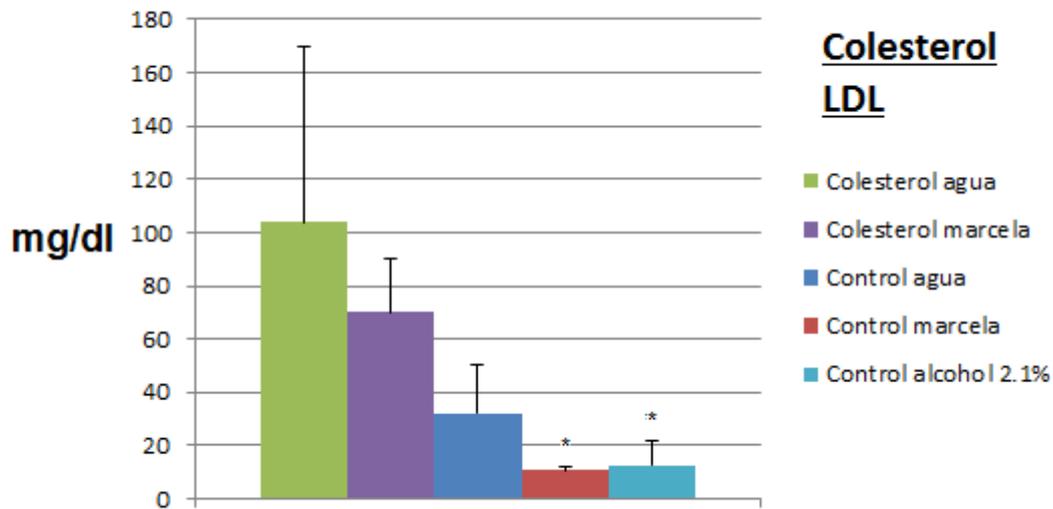


Figura 13: Nivel de colesterol LDL en suero sanguíneo. Los datos representan las medias \pm DS. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANOVA seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

4. Colesterol HDL

Se observó un aumento en los niveles de colesterol HDL en todos los grupos comparados con el grupo control hipercolesterolémico, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

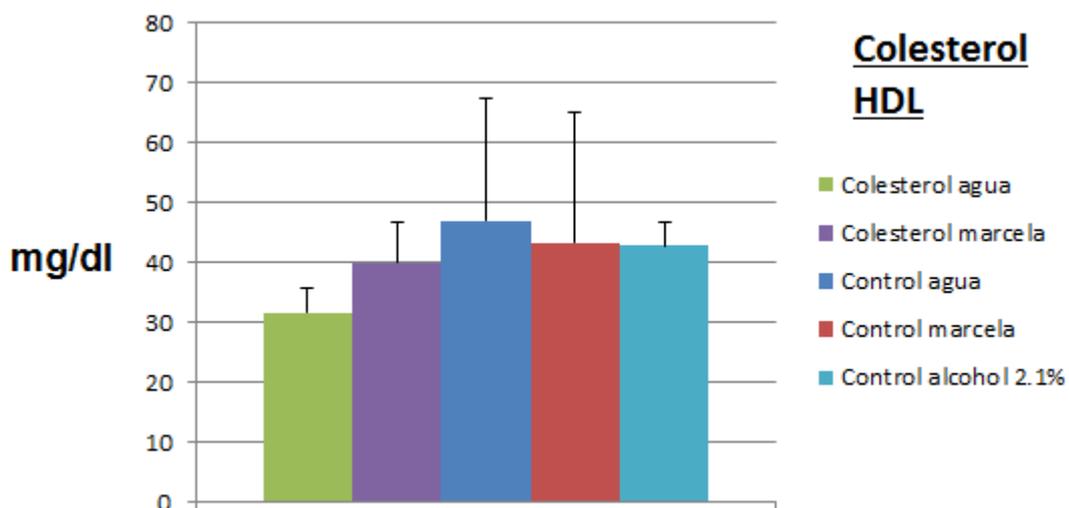


Figura 14: Nivel de colesterol HDL en suero sanguíneo. Los datos representan las medias \pm DS. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANOVA seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

5. Índice Col HDL/Col no HDL

El índice entre colesterol HDL y colesterol no HDL es utilizado en la clínica como predictor de ACV (>4.5 en humanos es considerado factor de riesgo). Se observó un decrecimiento para este índice tanto en el grupo hipercolesterolémico tratado con marcela como para los 3 controles de comida sin colesterol agregado, aunque solo estos 3 lograron mostrar diferencia estadísticamente significativa.

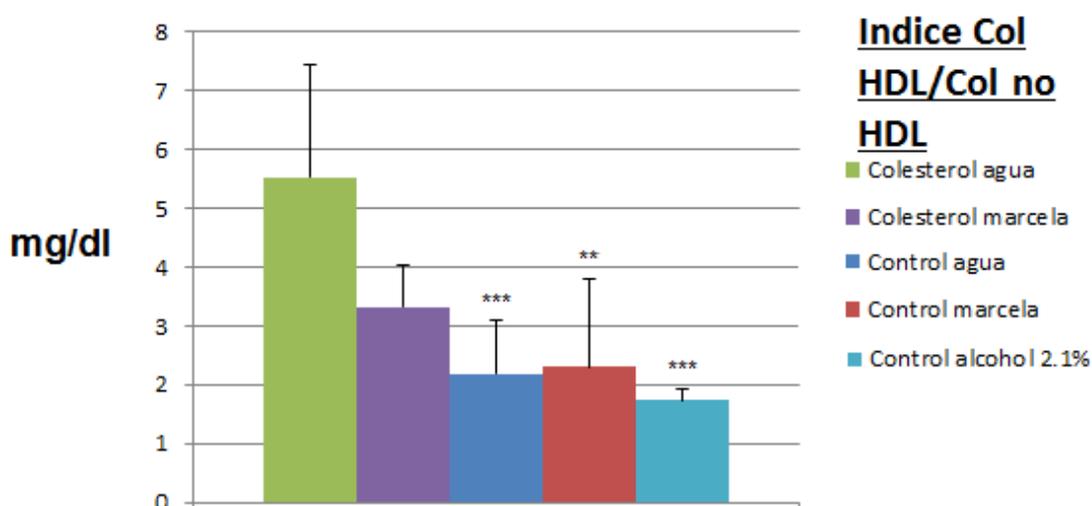


Figura 15: Coeficiente entre colesterol HDL y colesterol no HDL. Los datos representan las medias \pm DS. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANOVA seguido por un test Tukey-Kramer de comparación múltiple (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la capacidad neuroprotectora de un preparado hidro-alcohólico de AS cuando se administra a ratas en un diseño pre-clínico durante 7, 14 y 21 días previos a la opACM durante 24 horas. El decrecimiento en la extensión de la lesión demostrada mediante la sal de tetrazolio y la recuperación en el comportamiento motor, son claras evidencias del efecto protector del preparado de AS. En relación al papel del preparado en el perfil lipídico realizado a ratas tratadas con una dieta hipercolesterolémica durante 5 semanas, se evidenció una influencia beneficiosa del preparado sobre algunos parámetros de ese perfil.

Se han descrito muchos ejemplos de los efectos neuroprotectores de diferentes preparados de plantas, como por ejemplo un extracto hidro-alcohólico obtenido de las raíces de *Angelica gigas*, planta muy utilizada en la medicina oriental, que logró reducir significativamente la lesión isquémica cuando fue administrado por vía oral 90 minutos en un post-tratamiento luego de la opACM⁵⁵. También un extracto etanólico de *Zingiber officinale*, conocido popularmente como Jengibre y utilizado ampliamente por sus propiedades medicinales en varios países asiáticos, fue capaz de reducir el volumen del infarto en un modelo de opACM así como de reducir el déficit cognitivo y la neurodegeneración, disminuyendo además el nivel de estrés oxidativo por el aumento de los niveles de algunas enzimas antioxidantes⁵⁶.

AS ha sido ampliamente estudiada en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* y en diferentes tipos de preparados. Así fue estudiado su potencial antioxidante *in vitro* en un cultivo de células PC12 sometidas a un daño oxidativo^{48,57} y sus acciones neuroprotectoras *in vivo* en una decocción administrada 21 días previos a la opACM² y también en una fracción compuesta con los principales flavonoides presentes en la decocción (quercetina y luteolina) denominada Fracción Neutra (FN), la cual demostró sus efectos neuroprotectores cuando fue administrada a los 14 días previos a la oclusión arterial (Comunicación personal. Tesis Lic. Vicente Ruiz). Ambos preparados lograron una disminución significativa del tamaño de la lesión isquémica con respecto a los animales isquémicos no tratados tanto con la decocción como con la FN y también las disfunciones motoras causadas por la opACM en los animales experimentales también fueron significativamente reducidas en ambos preparados.

La capacidad neuroprotectora de los preparados de As ha sido justificada por la presencia de los flavonoides quercetina y luteolina, los cuales han sido reportados como neuroprotectores en diferentes modelos experimentales^{58,59}. En tal sentido niveles cerebrales significativos de quercetina, fueron cuantificados en el tejido cerebral de animales estudiados después de recibir un tratamiento continuado con este flavonoide administrado por la vía oral. En este mismo estudio el potencial antioxidante de la quercetina fue confirmado. Estos resultados demuestran que la administración continuada de quercetina por vía oral puede ser capaz de permitir a este flavonoide atravesar la barrera hematoencefálica y tener acciones neuroactivas⁶⁰.

Uno de los aspectos a considerar y esclarecer en este trabajo, es la diferencia encontrada en cuanto al tamaño de la lesión isquémica entre los grupos pre-tratados durante los días 7 y 14 y el grupo tratado durante 21 días. Si bien en todos los grupos se observó un

efecto neuroprotector significativo en comparación con el grupo isquémico no tratado con AS, el porcentaje de infarto fue mayor en el grupo de 21 días, lo que confirma que un pre-tratamiento más continuado produce una menor protección del tejido cerebral.

Esto puede ser atribuible a la actividad pro-oxidante y citotóxica descrita para la quercetina, la cual fue observada en modelos *in vitro*⁶¹. Si bien la concentración a la cual la quercetina produce estos efectos adversos varía dependiendo del ambiente oxidativo y la concentración y localización intracelular, ha sido reportado en varios estudios que a concentraciones mayores a 100 μ M de quercetina, esta puede producir un efecto pro-oxidante, apoptótico, anti-proliferativo, citotóxico y genotóxico^{62,63}. Los resultados obtenidos en esta tesis estarían confirmando que aunque el ambiente oxidativo en el que se ha sido mantenido el tejido cerebral es similar (24 hs de opACM), la acumulación diferencial de quercetina dependiendo del tiempo de tratamiento ha sido el factor responsable que pudiera explicar el aumento del tamaño del infarto en los animales tratados durante 21 días.

En relación a los resultados obtenidos en el test de comportamiento motor realizado a los animales, previo al sacrificio y después de las 24 horas de la opACM, se cuantificó una reducción en el puntaje obtenido por el grupo pre-tratado con el extracto de AS, en comparación con el grupo isquémico sin pre-tratamiento.

Las áreas cerebrales lesionadas por la opACM corresponden a las zonas del estriado y la corteza parietal², áreas encargadas del procesamiento e integración de la información sensorio-motora cerebral. Esta confirmación puede explicar la mejoría en el comportamiento motor de las ratas isquémicas tratadas con AS al recibir las neuronas de las áreas mencionadas los efectos beneficiosos de los componentes polifenólicos de AS.

Teniendo en cuenta que la hipercolesterolemia es un factor predictor de los accidentes cerebrovasculares, en esta tesis se estudiaron los posibles beneficios del extracto de AS sobre el perfil lipídico de animales sometidos a una dieta hipercolesterolémica durante 5 semanas. A tal efecto se realizó el control semanal del incremento del peso corporal de los animales en estudio, así como el consumo de alimentos y agua y/o AS diariamente.

En cuanto al incremento de peso, el grupo hipercolesterolémico pre-tratado con el extracto de AS, mostró una disminución significativa del 80% del peso de los animales en comparación con el grupo hipercolesterolémico pre-tratado con agua. Esto podría explicarse por los datos aportados en un estudio realizado por Dickel et al. (2007) donde AS fue incluida en un listado

de plantas tradicionales utilizadas en Rio Grande del Sur por sus propiedades para reducir el aumento de peso corporal. Esta propiedad es atribuida a su capacidad de disminuir los niveles de glucosa en la sangre⁶⁴.

En relación al consumo de alimentos y líquidos se observaron diferencias significativas entre algunos de los grupos estudiados. Así el grupo colesterol/agua mostró un incremento en el consumo de alimentos. En comparación con el grupo control tratado con agua, los restantes grupos mostraron un menor consumo de líquido. Estas diferencias tratamos de explicarlas asumiendo que se deben a la habituación dietaria de los animales al sabor y olor del colesterol y/o marcela adicionados a su dieta habitual.

Datos aportados en la literatura confirman que mientras un nivel bajo de Col-HDL es indicador de un alto riesgo para enfermedades cardio y cerebrovasculares, un aumento en los niveles de Col-HDL podría potencialmente contribuir a la anti-arterogenicidad, inhibir la producción de LDL y proteger a las células endoteliales de los efectos citotóxicos de las LDL oxidadas^{65,66}.

Estudios epidemiológicos demostraron que el consumo de polifenoles se correlaciona con un decrecimiento en los riesgos de arterioesclerosis, esto debido a sus efectos antioxidantes. Quercetina y luteolina son potentes antioxidantes naturales⁶⁷ y esta función es responsable de su actividad anti-arteriosclerótica^{68,69}.

Nekohashi et al en 2014 postulan que no solo los efectos antioxidantes de los polifenoles son los responsables de estos efectos. Estos autores confirmaron que los polifenoles quercetina y luteolina (flavonoides constitutivos de AS) inhiben el transporte intestinal del colesterol. Ellos demostraron que la pre-incubación de una línea celular denominada Caco-2 con Luteolina y Quercetina, disminuyó la absorción del colesterol en estas células y los niveles de colesterol en el suero de los animales alimentados con colesterol y luteolina ó quercetina disminuyó significativamente comparados con las ratas alimentadas solo con colesterol⁵⁰.

En nuestro trabajo el grupo hipercolesterolémico tratado con AS mostró, en comparación con el grupo hipercolesterolémico no tratado, decrecimientos del 26 % en el colesterol total, 51% en el nivel de triglicéridos, 33% en el colesterol LDL y de 40% en el índice Col HDL/Col no HDL, así como un aumento del 27% en el nivel de colesterol HDL. Estos datos apuntan hacia un efecto benéfico del consumo del extracto en el perfil lipídico de los animales.

CONCLUSIONES GENERALES

Los compuestos polifenólicos presentes en algunas especies de plantas han sido ampliamente estudiados en la literatura científica internacional como antioxidantes y neuroprotectores frente a la isquemia cerebral experimental y también como capaces de reducir los niveles de colesterol frente a la hipercolesterolemia experimental.

Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido corroborar estas afirmaciones mostrando que un extracto hidro-alcohólico de *Achyrocline satureioides* (marcela) contiene compuestos polifenólicos como la quercetina y luteolina que fueron capaces de reducir significativamente el volumen de un infarto cerebral producido por la opACM y reducir las deficiencias sensorio-motoras causadas por la oclusión arterial. También pudimos cuantificar efectos beneficiosos en el perfil lipídico de los animales sometidos a una dieta hipercolesterolémica durante 5 semanas, lo que se demostró por una tendencia a la reducción en los valores de colesterol, triglicéridos y colesterol LDL.

Consideramos que los resultados experimentales obtenidos en este trabajo podrán servir como base para confirmar los efectos de AS y para realizar futuras exploraciones del potencial neuroprotector y anti-hipercolesterolémico de los compuestos bioactivos y de esa forma investigar más ampliamente su valor nutricional en la Fitomedicina y otras aplicaciones médicas.

PERSPECTIVAS

En nuestro trabajo pudimos evidenciar los efectos benéficos del extracto tanto en el daño provocado por la isquemia como en el perfil lipídico de los animales. En investigaciones futuras pretendemos aumentar el número de animales con el fin de confirmar estos resultados y también poder realizar un estudio sometiendo ratas hipercolesterolémicas pre tratadas o no con el extracto a la OpACM. Desafortunadamente la falta de financiación para este trabajo hizo imposible su ejecución, debido al alto costo económico y la disponibilidad de animales para realizarlo.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial para todos los que ayudaron a realizar este trabajo:

A la Dra. Felicia Rivera, la persona que me enseñó todo, me dio todas las oportunidades, estaré eternamente agradecido.

Al Dr. Federico Dajas, por permitirme unirme a este grupo de investigación y darme la posibilidad de desarrollar esta tesis en su departamento.

A todo el departamento de Neuroquímica, por la ayuda, las enseñanzas y los momentos compartidos durante todo este proceso.

A la Dra. Alicia Olascoaga por darme su laboratorio a disposición para realizar los análisis sanguíneos.

Al Dr. Melchor Pacheco, por la ayuda a elaborar el alimento hipercolesterolémico.

A Leandro Pereyra, Fernando Alayon y la empresa MONTEVI, que ayudaron a lograr la forma pelletizada del alimento, ahorrándome semanas de trabajo.

Un agradecimiento a todos los que, sin participar en este estudio, ayudaron a hacerlo posible:

A mis padres, que fueron mi gran apoyo y los responsables de que haya elegido estudiar.

A Lucía, por bancarme la cabeza, apoyarme en todo y darme fuerzas día a día para seguir.

A La Banda del Paño, mis amigos incondicionales, la victoria de uno es la victoria de todos.

A todos mis compañeros de facultad que me acompañaron durante todos estos años.

“Walk on, with hope in your heart and you’ll never walk alone”

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akaberi, A., Golshan, A., Moojdekanloo, M., & Hashemian, M. Does fasting in Ramadan ameliorate Lipid profile? A prospective observational study. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **30(4)**, 708–711 (2014).
2. Rivera F, Tejera D, Abin A, Prunell G, Martinez M, Dajas F. Achyrocline satureioides (Lam.) DC. (marcela) reduce brain damage in permanent focal ischemia in rats. *Revista cubana de plantas medicinales* **18(3)**, 445-460 (2013).
3. Mbikay M, Sirois F, Simoes S, Mayne J, Chrétien M. Quercetin-3-glucoside increases low-density lipoprotein receptor (LDLR) expression, attenuates proprotein convertase subtilisin/kenin 9 (PCSK9) secretion, and stimulates LDL uptake by Huh7, human hepatocytes. *FEBS Open Bio* **4**, 755-762 (2014).
4. Saita E., Kondo K., Momiyama Y. Anti-Inflammatory Diet for Atherosclerosis and Coronary Artery Disease: Antioxidant Foods. *Clin Med Insights Cardiol.* **8**, 61-65 (2015).
5. Cho KJ, Cheon SY, Kim GW Statins Promote Long-Term Recovery after Ischemic Stroke by Reconnecting Noradrenergic Neuronal Circuitry *Hindawi Publishing Corporation Neural Plasticity* ID 585783 (2015).
6. Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 110–115 (2004).
7. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, 256:2835 (1986).
8. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* **352**, 1685–1695 (2005).
9. Roger, V. L. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **125**, e2–e220 (2012).
10. Austin MA, McKnight B, Edwards KL, et al Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: a 20 years prospective study. *Circulation* **101**, 2777-82 (2000).
11. Simons LA, Simons J, Friedlander Y, McCallum J. A comparison of risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke: the Dubbo Study of Australian Elderly. *Heart Lung Circ* **18**, 330-3 (2009).
12. Ansell BJ. Cholesterol, stroke risk, and stroke prevention. *Curr Atheroscler Rep.* **2(2)**, 92-6 (2000).

13. Gadgil MD, Anderson CA, Kandula NR, Kanaya AM. Dietary Patterns in Asian Indians in the United States: An Analysis of the Metabolic Syndrome and Atherosclerosis in South Asians Living in America Study. *J Acad Nutr Diet*. In press (2013).
14. Davis HR Jr, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 679–683 (2009).
15. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* **74**, 213-220 (2010).
16. Weng S, Sprague JE, Oh J, Riek AE, Chin K, Garcia M, Bernal-Mizrachi C. Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice. *PLoS One*. **8**, e54625 (2013).
17. Libby P. Lipid-lowering therapy stabilizes plaque, reduces events by limiting inflammation. *Am J Manag Care 1 Suppl* **4** (2002).
18. Marinangeli CPF, Varady KA, Jones PJH Plant sterols combined with exercise for the treatment of hypercholesterolemia: overview of independent and synergistic mechanisms of action. *J Nutr Biochem* **17**, 217–224 (2006).
19. Ryan DH. Diet and exercise in the prevention of diabetes. *Int J Clin Pract Suppl*. **134**, 28–35 (2003).
20. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. **160(1)**, 1-40 (2006).
21. Melo A, Monteiro L, Lima RM, Oliveira DM, Cerqueira MD, El-Bachá RS. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. 467180 (2011).
22. Malinin NL, West XZ, Byzova TV. Oxidation as "the stress of life". *Aging* **9**, 906-10 (2011).
23. Paull Christine L., Annika Ryan, Shiho Rose, John R. Attia, Erin Kerr, Claudia Koller, Christopher R. Levi. How can we improve stroke thrombolysis rates? A review of health system factors and approaches associated with thrombolysis administration rates in acute stroke care. *Implementation Science* **11**, 51 (2016).
24. Agency for Healthcare Research and Quality. Household component summary table. In: Medical Expenditure Panel Survey. *U.S. Department of Health and Human Services* (2012).
25. Rosamond K, Flegal K, Purie E. Heart disease and stroke statistic- update: a report from the American Heart Association statistics committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation* **117**, e25-e46 (2008).

26. Kunz, A., Dirnagl, U. & Mergenthaler, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology* **24**, 495–509 (2010).
27. Ishibashi S, Kuroiwa T, Katsumata N, Yuan SL, Endo S, Mizusawa H. Extrapyramidal motor symptoms versus striatal infarction volume after focal ischemia in mongolian gerbils. *Neuroscience* **127**, 269–275 (2004).
28. Ketzoian, C; Rega, I.; Caseres, R.; Dieguez, E.; Coirolo. G.; Chouza, C. Estudio de la prevalencia de las principales enfermedades neurológicas en un población del Uruguay. *La Prensa Médica Uruguaya. Órgano de la Asociación Médica del Uruguay*. Vol XVIII, **3**, 9-26 (1997).
29. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Transl Med.* **7**, 97 (2009).
30. Gonzalez R, Hirsch J, Lev, M.H., Schaefer, P.W., Schwamm, L.H. Maging and intervention. Springer; Acute ischemic stroke (2012).
31. Armstead K, Ganguly JW, Kiessling W. Signaling delivery and age as emerging issues in the benefit/risk ratio outcome of tPA for treatment of CNS ischemic disorders, *Journal of Neurochemistry* **113**, 303-312 (2010).
32. Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D. Nutrition, brain aging and neurodegeneration. *J Neurosci.* **29**, 12795-12801 (2009).
33. Lee, J.M.; Nael, Al.A.; Ansgar, M.B.; Jeffrey, R.K.; Frederick, E.S. y Carlos Portera Cailliau Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A Perspective on the contributions of apoptosis y necrosis. *Brain Research Bulletin.* **46**, 281-309 (1998).
34. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84–91 (1989).
35. Dewar D., Yam, P. Y McCulloch, J. Drug development for stroke : importance of protecting cerebral white matter. *European Journal of Pharmacology.* **375**, 41-50 (1999).
36. Mies G, Ishimaru, S, Xie, Y, Seo KY, Hossmann KA. Ischemia thresholds of cerebral protein synthesis y energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metabolism* **11**, 753-761 (1991).
37. Menzies SA, Hoff JT, Betz H. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* **31**, 100-107 (1992).
38. Hwang IK, Lee CH, Yoo KY et al. Neuroprotective effects of onion extract and quercetin against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *J Med Food.* **12**, 990-995 (2009).

39. Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, Morquio A, Heinzen H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotoxicity Research* **5**, 425-432 (2003).
40. Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Abín-carrquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafón L, Heinzen H, Ferreira M, Morquio A. Neuroprotection by flavonoids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 1613-1620 (2003).
41. Rivera F, Costa G, Abin A, Urbanavicius J, Arruti C, Casanova G, Dajas F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotoxicity Research* **13**, 105-114 (2008).
42. Filot Da Silva L, Langeloh A. Comparative activity of hydroalcoholic 80% (v/v) of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) with papaverine and atropine on rat isolated jejunum. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **13**, 35-40 (1994).
43. Desmarchelier C, Coussio J, Ciccía G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (AS). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 1163-1170 (1998).
44. De Souza KCB, Schapoval EES, Bassani VL. LC determination of flavonoids: separatin of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 771-777 (2002).
45. Cosentino M, Bombelli R, Carcano E, et al., Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**, 501-507 (2008).
46. De Souza KCB, Bassani VL, Schapoval EES. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine* **14**, 102-108 (2007).
47. Morquio A, Rivera-Megret F, Dajas F, Photoprotection by Topical Application of *Achyrocline satureioides* ("Marcela"). *Phytotherapy Research* **19**, 486-490 (2005).
48. Arredondo, M. F. et al. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology* **91**, 13–20 (2004).
49. Rivera F, Gervaz E, Sere C, Dajas F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (AS). *Journal Ethnopharmacology* **95**, 359-362 (2004).
50. Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, et al. Luteolin and Quercetin Affect the Cholesterol Absorption Mediated by Epithelial Cholesterol Transporter Niemann–Pick C1-Like 1 in Caco-2 Cells and Rats. *PLoS ONE* **9**, e97901 (2014).

51. Chiang, T., Messing, R. O. & Chou, W.-H. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *Journal of visualized experiments: JoVE* **955**, 9–10 (2011).
52. Preston E, Webster J. Spectrophotometric measurement of experimental brain injury. *Journal of Neuroscience Methods* **94**, 187-192 (2000).
53. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain Stereotaxic Coordinates, 3rd ed. *Academic Press, San Diego, CA* 375-415 (1985).
54. Seong JY, Ju RK, Chae KL, Jeong EH, Jae HL. Gastrodia elata Blume and an Active component, p-Hydrobenzyl Alcohol Reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions. *Biol. Pharma.*(2005).
55. Oh TW, Park K-H, Jung HW, Park Y-K. Neuroprotective effect of the hairy root extract of *Angelica gigas* NAKAI on transient focal cerebral ischemia in rats through the regulation of angiogenesis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **15**, 101 (2015).
56. Wattanathorn J, Jittiwat J, Tongun T, Muchimapura S, Ingkaninan K. *Zingiber officinale* Mitigates Brain Damage and Improves Memory Impairment in Focal Cerebral Ischemic Rat. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. 429505 (2011).
57. Arredondo, F. *et al.* After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free radical biology & medicine* **49**, 738–47 (2010).
58. Moon, J. H.; Tsushida, K.; Nakahara, K.; Terao, J. Identification of quercetin 3-O-B-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1274-1285 (2001).
59. Qand Agha Nazari¹ , Toshiaki Kume¹ , Yuki Takada-Takatori² , Yasuhiko Izumi¹ , and Akinori Akaike Protective Effect of Luteolin on an Oxidative-Stress Model Induced by Microinjection of Sodium Nitroprusside in Mice. *J Pharmacol Sci* **122**, 109 – 117 (2013).
60. Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Ito M, Miyamoto K, Tsuji A, Kawai Y, Terao J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radic Biol Med.* **51**, 1329-36 (2011).
61. Dajas F, Abin-Carriquiry JA, Arredondo F, Blasina F, Echeverry C, Martínez M, Rivera F, Vaamonde L. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochem Int.* **89**, 140-8 (2015).
62. Cotelle, N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*, **1(6)**, 569–90 (2001).
63. Lambert, J.D., Sang, S. & Yang, C.S. Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chemical research in toxicology*, **20(4)**, 583–5 (2007).
64. Dickel ML, Rates SM, Ritter MR. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J Ethnopharmacol.* **109**, 60-71 (2007).

65. Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High-density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham heart study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **8**, 737–41 (1988).
66. Assmann G, Nofer J. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* **54**, 321–41 (2003).
67. Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, et al. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radic Res* **47**, 451–462 (2013).
68. Opie LH, Lecour S The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur Heart J* **28**, 1683–1693 (2007).
69. Anderson JW, Baird P, Davis RH Jr, Ferreri S, Knudtson M, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* **67**, 188–205 (2009).