



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Médicas



**“CAPACIDAD XENOHORMÉTICA DE FITOEXTRACTOS
Y SUS DERIVADOS FRENTE A
INMUNOTOXICIDAD POR ARSÉNICO”**

Trabajo de Tesis para optar por el Título de Doctora en
Ciencias de la Salud.

Lic. en Nutrición CANALIS, Alejandra Mariel

Córdoba, Argentina

AÑO 2018

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Director:

Prof. Dr. SORIA, Elio Andrés

Co-Directora:

Prof. Dra. BONGIOVANNI, Guillermina Azucena

Integrantes:

Prof. Dr. ERASO, Jorge Alberto

Prof. Dra. QUIROGA, Patricia Liliana

Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud:

**“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”**

A mi esposo y mi hijo Benicio,
mis motores de cada día y fuente de inspiración...

AGRADECIMIENTOS

No puede aspirarse a obtener el grado de Doctora si no se ha aprendido a ser agradecida de cuánta persona e institución hizo posible que mi proyecto de tesis hoy sea una realidad. Aquí voy...

Gracias Elio, por invitarme a tomar este camino cuando mis metas eran tan inciertas, por la paciencia, por tu entrega, por las horas dedicadas y por enseñarme dónde ver sin decirme que mirar. Sos un verdadero maestro... de esos que inspiran y sacan lo mejor de cada uno, y lo que he aprendido de vos, no sólo en lo académico, me acompañará toda la vida. Pero por sobre todas las cosas, gracias por confiar en mí...

Gracias Dr. Eraso y Dra. Quiroga por el tiempo brindado, los conocimientos ofrecidos y la predisposición para atender mis consultas y pedidos.

Gracias compañeros del día a día por los mates compartidos, por el trabajo en equipo... sin ustedes no hubiera sido lo mismo. Fueron un gran sostén en los días difíciles y grata compañía en los alegres.

Gracias a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de esta Universidad, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al Instituto Nacional del Cáncer, por los apoyos económicos y académicos brindados.

Gracias mamá y papá por los sacrificios y la determinación con la que lucharon para darme la oportunidad de empezar un día mi vida universitaria. Esta tesis es el fiel reflejo del esfuerzo de ustedes y los valores en que fuimos educados.

Gracias Gon por ser mi otra mitad en la vida, por no dejar de estar y contar conmigo a pesar de la distancia.

Gracias Bruno por todo tu amor, por ser mi sostén incondicional, por soñar conmigo y ayudarme a hacerlo realidad, por creer en mí, por tu paciencia de oro y por alentarme a seguir adelante cuando todo se torna difícil.

Gracias hijo por hacerme mejor persona, por las horas de juego prestadas, por tu pequeño y gran amor y por ser mi mayor inspiración en este mundo.

ÍNDICE

RESUMEN	11
SUMMARY	13
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Sistema Inmune.....	15
1.1.1. Generalidades	15
1.1.2. Organización del sistema inmune	16
1.1.3. El bazo en el sistema inmune	17
1.1.4. Inmunodeficiencia secundaria	18
1.2. Arsénico.....	18
1.2.1. Generalidades	18
1.2.2. Efectos sobre la salud.....	20
1.2.3. Situación sanitaria en la República Argentina.....	22
1.2.4. Toxicocinética.....	23
1.2.5. Mecanismos de acción	25
1.3. Fitoquímicos como inmunomoduladores	26
1.3.1. Generalidades	26
1.3.2. Plantas nativas ensayadas	27
1.3.3. Compuestos fenólicos	28
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	31
<i>Objetivo General</i>	31
<i>Objetivos Específicos</i>	31
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1. Equipamiento	32
2.2. Metodología	32
2.2.1. <i>Contenido fenólico en extractos de Lantana grisebachii, Aspidosperma quebracho-blanco e Ilex paraguariensis y su biodisponibilidad por ingesta en timo, bazo y sangre.</i>	32
2.2.1.1. Obtención de fitoextractos a partir de infusiones	32
2.2.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos en fitoextractos	33
2.2.1.3. Ensayo de consumo oral de los fitoextractos	33

2.2.1.4. Cuantificación de compuestos fenólicos tisulares	34
2.2.1.5. Análisis estadístico	34
2.2.2. <i>Efecto del consumo de fitoextractos de Lantana grisebachii, Aspidosperma quebracho-blanco e Ilex paraguariensis sobre el balance redox en timo, bazo y sangre.</i>	34
2.2.2.1. Condiciones experimentales	34
2.2.2.2. Medición de marcadores oxidativos	35
2.2.2.3. Análisis estadístico	36
2.2.3. <i>Efecto xenohormético en esplenocitos de los fitoextractos seguros frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.</i>	36
2.2.3.1. Desarrollo del modelo experimental	36
2.2.3.2. Aplicación del modelo experimental.....	38
2.2.3.3. Cultivo primario de esplenocitos	39
2.2.3.4. Determinación de viabilidad	39
2.2.3.5. Análisis estadístico	40
2.2.4. <i>Cambios oxidativos en sangre, bazo y timo asociados al uso del fitoextracto seguro y bioactivo en toxicidad aguda inducida por arsénico.</i>	40
2.2.4.1. Condiciones experimentales	40
2.2.4.2. Medición de compuestos bioactivos.....	41
2.2.4.3. Medición de marcadores oxidativos	41
2.2.4.4. Medición de grupos sulfhidrilos	42
2.2.4.5. Análisis estadístico	43
2.2.5. <i>Vías metabólicas involucradas en la bioactividad del fitoextracto seleccionado frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.</i>	43
2.2.5.1. Condiciones experimentales	43
2.2.5.2. Medición de glucosa.....	43
2.2.5.3. Medición de lactato	44
2.2.5.4. Medición de anión superóxido (SO).....	44
2.2.5.5. Medición de grupos sulfhidrilos	44
2.2.5.6. Medición de NF-κB activo	45
2.2.5.7. Determinación del potencial mitocondrial	45
2.2.5.8. Análisis estadístico	46
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	47

3.1. Contenido fenólico en extractos de <i>Lantana grisebachii</i> , <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> y su biodisponibilidad por ingesta en timo, bazo y sangre.	47
3.1.1. Contenido de compuestos fenólicos en fitoextractos	47
3.1.2. Evaluación ponderal de los individuos	47
3.1.3. Contenido de compuestos fenólicos tisulares	48
3.2. Efecto del consumo de fitoextractos de <i>Lantana grisebachii</i> , <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> sobre el balance redox en timo, bazo y sangre.	50
3.2.1. Formación de Anión Superóxido	50
3.2.2. Peróxidos acuosos y lipídicos (HP y LP)	51
3.2.3. Formación de nitritos	53
3.3. Efecto xenohormético en esplenocitos de los fitoextractos seguros frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.	53
3.3.1. Determinación de viabilidad	53
3.4. Cambios oxidativos en sangre, bazo y timo asociados al uso del fitoextracto seguro y bioactivo en toxicidad aguda inducida por arsénico.	54
3.4.1. Medición de compuestos bioactivos.....	54
3.4.2. Medición de marcadores oxidativos	57
3.4.3. Medición de grupos sulfhidrilos	59
3.5. Vías metabólicas involucradas en la bioactividad del fitoextracto seleccionado frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.	60
3.5.1. Medición de glucosa.....	60
3.5.2. Medición de lactato	61
3.5.3. Medición de anión superóxido (SO).....	62
3.5.4. Medición de grupos sulfhidrilos	63
3.5.5. Medición de NF-κB activo	64
3.5.6. Determinación del potencial mitocondrial	65
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	66
4.1. Contenido fenólico en extractos de <i>Lantana grisebachii</i> , <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> y su biodisponibilidad por ingesta en timo, bazo y sangre.	67
4.2. Determinación del efecto del consumo de fitoextractos de <i>Lantana grisebachii</i> , <i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> sobre el balance redox en timo, bazo y sangre.	69
4.3. Efecto xenohormético en esplenocitos de los fitoextractos seguros frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.	70

4.4. Cambios oxidativos en sangre, bazo y timo asociados al uso del fitoextracto seguro y bioactivo en toxicidad aguda inducida por arsénico.	72
CONCLUSIONES	79
CAPÍTULO 5: Bibliografía	81
ANEXOS	95
ANEXO 1: Producción Científica	96
ANEXO 2: Modelo Experimental N°1	99
ANEXO 3: Modelo Experimental N°2	102

PRINCIPALES ABREVIATURAS

As: Arsénico.

As(III): Arsénico trivalente.

As(V): Arsénico pentavalente.

MMA: Ácido metilarsónico.

DMA: Ácido dimetilarsínico.

GSH: Glutati6n.

LG: *Lantana grisebachii* Stuck.

AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltld.

IP: *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

AC: Ácido clorogénico.

DL50: Dosis Letal 50.

ip: Intraperitoneal.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

ERN: Especies reactivas de nitr6geno.

EAG: Equivalentes de ácido gálico.

EQ: Equivalentes de quercetina.

SO: Anión super6xido.

HP: Per6xidos acuosos o hidroper6xidos.

LP: Per6xidos lipídicos o lipoper6xidos.

NO: 6xido nítrico.

PAOP: Productos avanzados de oxidaci6n proteica.

SH: Grupos sulfhidrilos.

EE: Error estandar.

RESUMEN

El arsénico (As) es un tóxico ambiental ampliamente diseminado en todo el mundo. Se encuentra como contaminante de alimentos y agua de bebida en numerosos países, entre ellos la República Argentina. Los órganos y tejidos que constituyen el sistema inmune son blancos de sus efectos deletéreos, por lo que los cambios que tienen lugar tras la exposición a As están relacionados con una respuesta inmunitaria afectada.

En este sentido, se ha informado que *Lantana grisebachii* Stuck. (LG), *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlttdl. (AQB) e *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (IP) presentan propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, por lo que el objetivo de la presente tesis fue establecer la capacidad xenohormética de los extractos acuosos de dichas plantas y sus derivados frente a inmunotoxicidad inducida por As. Para ello, se ensayaron, en primera instancia, los efectos del consumo oral (100 mg de extracto seco/Kg/día durante 30 días) de los fitoextractos en ratones Balb/C ($n \geq 3$) de ambos sexos, mediante la determinación de los compuestos fenólicos aportados por éstos y su biodisponibilidad en los tejidos hemolinfáticos, el análisis de trofismo orgánico y parámetros de estrés oxidativo tales como peróxidos acuosos y lipídicos (HP y LP respectivamente), anión superóxido (SO) y nitritos en bazo, timo y sangre murinos. El análisis de los datos (ANAVA, $p < 0,05$) confirmó a los tres extractos ensayados como fuentes de compuestos fenólicos (IP, LG y AQB en orden decreciente), aunque su biodisponibilidad en los tejidos hemolinfáticos estuvo condicionada por el sexo, presentando las hembras concentraciones mayores en general. En cuanto a la respuesta redox, el consumo de LG tuvo un efecto prooxidante a partir de una inducción desigual en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en machos y hembras. AQB, por su parte, redujo la peroxidación en sangre y bazo de ambos sexos, con regulación nitrosativa positiva en timo, aunque los efectos antioxidantes no dependieron de los fenoles. Por último, IP exhibió efectos disímiles según sexo, mostrando los machos ciertos efectos antioxidantes, mientras que las hembras fueron susceptibles a estrés oxidativo.

Posteriormente, se eligieron los extractos identificados de uso seguro (AQB e IP) y se procedió a evaluar su potencial protector frente a As, en un modelo animal desarrollado a tal efecto. Así, los animales recibieron, por vía oral, 50-100 mg/Kg de extracto de AQB o IP, y 0

mg/Kg (control) y, luego de 3 horas, fueron inyectados intraperitonealmente con 100 μ L de solución fisiológica (control) o 19 mg/Kg de NaAsO₂ (DL50). Se obtuvieron, por cultivo primario de bazo, esplenocitos sobre los cuales se aplicó el ensayo de viabilidad celular de resazurina, observando un descenso significativo de este parámetro por exposición a As, el cual es recuperado por la administración oral previa de IP (50 mg/Kg). AQB, por su parte, resultó tóxico *per se*, además de no proteger a las células frente a As. Luego, se determinó la concentración tisular de compuestos fenólicos y hierro en los bazos, timos y sangre de los animales tratados con As, IP e IP + As (*versus* control), y se evaluaron marcadores oxidativos [HP y LP, productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) y grupos sulfhidrilos libres (SH)] para establecer el efecto redox del NaAsO₂, de IP (fitoextracto bioactivo) y el uso concomitante de ambos. El análisis de los resultados (ANAVA, $p < 0,05$) mostró que la exposición a As disminuye la concentración de SH libres en esplenocitos y bazo y altera el contenido y distribución del hierro en bazo, pero no incrementa la producción de peróxidos en este órgano, por lo que la inducción de estrés oxidativo no sería la vía involucrada en la pérdida de viabilidad celular. IP, por su parte, incrementa los niveles de SH libres, recupera los valores dosados de hierro y genera niveles elevados de peróxidos, y consecuentemente de PAOP, por lo que el aumento de los compuestos fenólicos que se verifica con la ingesta de IP tendría un efecto prooxidante. Para establecer las vías metabólicas involucradas en los efectos descritos, se determinó la concentración de glucosa, lactato, anión superóxido (SO) y SH libres en los esplenocitos. Así, se determinó que la exposición a arsénico conlleva a una reducción en la función mitocondrial de los mismos que deriva en la muerte celular. Por otra parte, el tratamiento con IP incrementa la captación de glucosa por los esplenocitos, lo cual aumentaría el metabolismo aeróbico por sobre el anaeróbico, con la consecuente disminución de lactato intracelular y la acumulación de ERO. Este efecto, junto con la capacidad de IP de inducir la actividad del NF- κ B, paralelamente determinada, condiciona una bioquímica celular diferente que responde manteniendo a la célula viable frente a la toxicidad del As.

Palabras claves: ARSÉNICO - INMUNOTOXICIDAD – LANTANA GRISEBACHII – ASPIDOSPERMA QUEBRACHO BLANCO – ILEX PARAGUARIENSIS.

SUMMARY

Arsenic (As) is an environmental toxic widely distributed worldwide. It is found as a food and water pollutant in several countries, including Argentina. Organs and tissues that constitute the immune system are targets of its deleterious effects; thus, the changes that occur after exposure to As are related to an impaired immune response.

In this sense, it has been reported that *Lantana grisebachii* Stuck. (LG), *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. (AQB) and *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (IP) have antiinflammatory and antioxidant properties; thus, the aim of this thesis was to establish the xenohormetic capacity of the aqueous extracts of this plants and their derivatives, against arsenic-induced immunotoxicity. First, the effects of oral consumption (100 mg of dry extract/Kg/day for 30 days) of phytoextracts were tested in Balb/C mice ($n \geq 3$) of both sexes, by determining of phenolic compounds and their bioavailability in hemolymphatic tissues, analysis of organic trophism and oxidative stress parameters, such as aqueous and lipid peroxides (HP and LP respectively), superoxide anion (SO) and nitrites in murine spleen, thymus and blood. The data analysis (ANOVA, $p < 0,05$) confirmed that the three extracts were sources of phenolic compounds (IP, LG and AQB in decreasing order), although their bioavailability in hemolymphatic tissues was conditioned by sex, with often higher concentrations in females. Regarding the redox response, LG consumption had a prooxidant effect with unequal induction of reactive oxygen species (ROS) production in males and females. On the other hand, AQB reduced peroxidation in blood and spleen of both sexes, with positive nitrosative regulation in thymus, although the antioxidant effects were not phenol-dependent. Finally, IP exhibited dissimilar effects according to sex, with some antioxidant effects in males, whereas females showed oxidative susceptibility.

Subsequently, the safe extracts were chosen (AQB and IP) to be used as potential protective agents against As in an animal model developed for this purpose. Thus, mice received 50-100 mg/Kg of AQB or IP extract, and 0 mg/Kg (control group). After 3 hours, they were intraperitoneally injected with 100 μ L of physiological solution (control group) or 19 mg/Kg of NaAsO₂ (LD50). Splenocytes were obtained by primary spleen culture to apply resazurin cell viability assay, verifying a significant decrease of this parameter by exposure to

As, which is recovered by the previous oral administration of IP (50 mg/Kg). AQB did not protect cells against As and, in addition, was toxic by itself. Then, tissue concentration of phenolic compounds and iron in the spleens, thymuses and blood of the animals treated with As, IP and IP + As (*versus* control group) was determined, and oxidative markers were evaluated [HP and LP, advanced products of protein oxidation (PAOP) and free sulfhydryl groups (SH)] to establish the redox effect of NaAsO₂, IP (bioactive phytoextract) and both ones. The data analysis (ANOVA, $p < 0,05$) showed that As exposure decreased the concentration of SH in splenocytes and spleen, altered the content and distribution of iron in spleen, but did not increase the production of peroxides in this organ. Therefore, induction of oxidative stress was not the mechanism involved in the observed cell death. Moreover, IP increased the levels of SH, recovered the levels of iron, but generated high levels of peroxides and consequent PAOP; thus, the verified increase of phenolic compounds after IP intake showed prooxidant effects. In order to establish the metabolic pathways involved in these effects, concentrations of glucose, lactate, superoxide anion (SO) y SH were determined in splenocytes. It was demonstrated that exposure to As caused reduction of mitochondrial function leading to cell death. On the other hand, IP treatment increased glucose uptake by splenocytes, which increased aerobic metabolism with respect to anaerobic metabolism, with the consequent decrease of intracellular lactate and accumulation of ROS. This effect, together the capacity of IP to induce NF- κ B activity, conditioned a different cellular biochemistry, which kept cell viability against the toxicity of the As.

Keywords: ARSENIC - IMMUNOTOXICITY – LANTANA GRISEBACHII – ASPIDOSPERMA QUEBRACHO BLANCO – ILEX PARAGUARIENSIS.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema Inmune

1.1.1. Generalidades

El término *inmunidad* proviene del latín, significa “privado de carga” (*in*, privativo; *munus*, carga). En un organismo humano sano, al igual que en otros seres vivos, el sistema inmune constituye un complejo conjunto de defensas contra las agresiones que pudiera sufrir por la presencia de agentes extraños y está constituido por una gran variedad de tejidos, células y moléculas capaces de llevar a cabo una serie de procesos que constituyen la *respuesta inmunitaria* (Kasper et al., 2016).

Se divide funcionalmente en innato o inespecífico y adquirido o específico y, de manera reciente, algunas investigaciones plantean la relación que podría existir entre ambos por la que el reconocimiento inmune innato del agente extraño (antígeno) activaría las respuestas inmunes adaptativas (Iwasaki y Medzhitov, 2010). En este sentido, la *respuesta inmunitaria innata* se constituye como un prerrequisito siendo la primera línea de defensa que actúa de forma inmediata frente al agente que ha conseguido ingresar al organismo o ante una célula propia que ha mutado. Por otra parte, la *respuesta inmunitaria adquirida* es llevada a cabo por los linfocitos, considerados por tal motivo las células principales del sistema inmune, de los cuales se diferencian dos tipos con funciones diferentes (Medzhitov, 2007). Los linfocitos B están relacionados con la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas que se liberan en los espacios extracelulares (inmunidad humoral), mientras que los linfocitos T, en interacción con otras células, promueven la eliminación del agente invasor (inmunidad celular). La respuesta adquirida tiene una duración de días a semanas (autorregulada para evitar que la respuesta se extienda en el tiempo) además de poseer una gran especificidad, diversidad, capacidad de discriminación y memoria (Blanco y Blanco, 2011).

Las conexiones que tienen lugar entre los distintos componentes del sistema inmune no han sido completamente entendidas, no obstante los estudios y avances en el área de la inmunología llevan a comprender una visión integrada del mismo y su función en la defensa

del huésped (Medzhitov et al., 2011). En este sentido, se concibe al sistema inmune como pilar fundamental en el mantenimiento de la homeostasis corporal, ya que cuando éste no funciona de forma adecuada, una innumerable cantidad de patologías pueden tener lugar por: inmunodeficiencia, autoinmunidad, hipersensibilidad, alergia e inflamación crónica (Marcos, 2011).

1.1.2. Organización del sistema inmune

El sistema inmune es considerado un sistema difuso, ya que se compone de un gran número de órganos, tejidos, células y mediadores químicos diseminados por todo el organismo, por lo que su localización es generalizada (Kasper et al., 2016).

Está compuesto por una variedad de elementos morfológica y funcionalmente distintos, que se diferencian a partir de células madres hematopoyéticas pluripotentes. A su vez, las células que conforman el sistema inmune, se organizan en tejidos y órganos en un sistema denominado linfático. Los tejidos y los órganos linfoideos se clasifican en primarios o centrales (médula ósea y timo) y secundarios o periféricos (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y tejido linfático asociado con mucosas). En los primeros tiene lugar la linfopoyesis (generación de células vírgenes), mientras que los segundos son los sitios de expansión y diferenciación de linfocitos de memoria y linfocitos efectores (Eynard et al., 2008).

En este sentido, las células responsables de la respuesta inmunitaria adquirida son originadas a partir de células progenitoras linfoides comunes (progenie linfoblástica) en la médula ósea (linfocitos vírgenes). Los linfocitos B permanecen en ese órgano hasta su maduración total; en cambio los precursores de los linfocitos T pasan al timo, donde sufren un proceso de diferenciación que los convierte en células T maduras. Una vez que han completado su maduración, tanto los linfocitos B como los T ingresan en la circulación y se dirigen al bazo, ganglios linfáticos, amígdalas y otros acúmulos de tejidos linfoide existentes en el organismo. En general, es en estos órganos donde se inician las respuestas inmunes (Blanco y Blanco, 2011).

A partir de los linfoblastos, también tienen lugar las células “asesinas” o *natural killer* (NK). Estas células constituyen un 5% de los linfocitos totales y poseen la función de unirse directamente a hongos, parásitos y células tumorales o infectadas por virus y programarlos

para su destrucción, empleando el sistema de perforinas y proteasas que inducen apoptosis (Eynard et al., 2008). Forman parte de la respuesta inmunitaria innata o inespecífica, la cual se compone además de una gran cantidad de elementos con diversas funciones: a) piel y mucosas, cuya integridad opone una barrera al acceso hacia los espacios intercelulares e intracelulares; b) enzimas de acción antimicrobiana, como la lisozima y las peroxidasas; c) otras células como los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos) circulantes en la sangre que ingieren y destruyen los agentes infecciosos d) y mediadores químicos que intervienen en los procesos de inflamación originados en respuesta a distintos microorganismos o partículas y procuran su destrucción (Kabelitz, 2012; Yanai et al., 2012).

1.1.3. El bazo en el sistema inmune

El bazo es el órgano más grande del sistema linfático. Se clasifica como órgano secundario, de morfología elongada, muy ricamente vascularizado que drena al sistema porta hepático. Se sitúa en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad abdominal, relacionado con el páncreas, el hemidiafragma y el riñón izquierdo (Mebius et al., 2005).

Su estroma está formado por un fino entramado reticular, con células estromales asociadas que sostienen las células del parénquima esplénico o esplenocitos. El parénquima, por su parte, está organizado de la siguiente manera (Steiniger, 2015; Cesta, 2006):

- La pulpa blanca, constituida por el tejido linfoideo que se dispone alrededor de una arteria o arteriola y forma folículos linfoideos (linfocitos B, células plasmáticas y células presentadoras de antígeno) y vainas linfoideas periféricas (linfocitos T y algunos linfocitos B). Actúa como una fuente sistémica de anticuerpos y linfocitos.
- La pulpa roja, constituida por los senos venosos y los cordones esplénicos, estos últimos conformados por linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos. Recapta y procesa los antígenos y glóbulos rojos envejecidos de la sangre.
- La zona marginal, que representa la zona de transición entre las pulpas blancas y rojas.

En la etapa prenatal el bazo participa en la elaboración de células sanguíneas (hemopoyesis esplénica). No obstante, en la adultez, constituye el centro de actividad de la inmunidad. En él confluyen el sistema inmune innato y adquirido, ya que responde de

manera inmediata e inespecífica frente a la presencia de un cuerpo extraño (producción de opsoninas y fagocitosis), y reacciona de forma específica contra los antígenos que llegan a los centros germinales del órgano transportados por la sangre circulante e interaccionan con las células del parénquima (formación de inmunoglobulinas M) (Chadburn, 2000; Tiron y Vasilescu, 2008).

En una función adicional, al ser un órgano que se interpone en la corriente sanguínea, el bazo actúa como reservorio de sangre capaz de vaciarse por contracción, además de poseer la capacidad de regular su composición química y celular mediante la captación y destrucción de plaquetas y glóbulos rojos envejecidos y la modulación del metabolismo de hierro, colesterol e hidratos de carbono (Steiniger, 2015; Brendolan et al., 2007).

1.1.4. Inmunodeficiencia secundaria

El término inmunodeficiencia refiere a la pérdida o reducción de las funciones inmunes de un organismo y se define como secundaria cuando deriva del accionar negativo (por exposición o supresión) de factores externos sobre las células y moléculas que componen el sistema (Chinen y Shearer, 2010; Savino y Dardenne, 2010). En este sentido, los agentes considerados inmunosupresores (por exposición) pueden ser clasificados, según su naturaleza, en agentes físicos (radiación), biológicos (anticuerpos, microorganismos) o químicos (drogas de distinta naturaleza, tóxicos ambientales como el arsénico), entre éstos últimos se reconocen un gran número de compuestos que ingresan por vía oral a través de la dieta y el agua de bebida (Grinyó et al., 2012).

1.2. Arsénico

1.2.1. Generalidades

El arsénico pertenece al Grupo 15 de la tabla periódica y, por encontrarse clasificado como elemento de transición o metaloide, posee también las propiedades físicas y químicas de los metales.

Los compuestos derivados de este elemento se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza terrestre y varían en su toxicidad para los mamíferos de acuerdo a su estado de

valencia, la naturaleza química y las características fisicoquímicas que de ello resulten. En este sentido, se conocen cuatro estados de valencia para este compuesto (-III, 0, III, V) (Orloff et al., 2009). El metaloide o arsénico elemental es una sustancia gris metálica, generalmente no tóxica debido a su insolubilidad en agua y fluidos orgánicos. No obstante, por la complejidad de su comportamiento químico, el arsénico puede también dar lugar a múltiples compuestos arsenicales de naturaleza orgánica e inorgánica donde se encuentra con estado de oxidación trivalente y pentavalente [As(III) y As(V)]. La toxicidad del As(III) es varias veces mayor que la del As(V) dada su mayor reactividad y se considera que los compuestos arsenicales de naturaleza inorgánica poseen un poder tóxico superior que los derivados orgánicos de este elemento (Hughes et al., 2011).

Entre los compuestos inorgánicos de As(III) más comunes se encuentran el trióxido de arsénico (As_2O_3) y el arsenito de sodio (NaAsO_2), mientras que las formas habituales de As(V) son el pentóxido de arsénico (As_2O_5), el ácido arsénico ($\text{H}_3\text{-AsO}_4$) y arsenatos como los de calcio, sodio y plomo [$\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$, Na_2HASO_4 , $\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$] (Lièvreumont et al., 2009). Por su parte, entre los compuestos arsenicales orgánicos más frecuentes se encuentran los trimetilados, arsenocolina, arsenobetaína, óxido de trimetilarsina y los arsenoazúcares (Sharma et al., 2009; Molin et al., 2015).

Por todo esto, millones de personas en el mundo se encuentran expuestas a la toxicidad de este elemento cuyas fuentes de procedencia pueden ser naturales o antropogénicas (Lozna et al., 2007). De manera natural, la disponibilidad de compuestos arsenicales en el ambiente está determinada por su presencia en rocas, minerales, yacimientos de carbón, volcanes, pozos o manantiales geotermales, suelos, aire y aguas superficiales y subterráneas. Por su parte, ciertas actividades del hombre como la fundición y refinación de metales no ferrosos (Pb, Zn y Cu), la minería, el uso de combustibles fósiles en plantas termoeléctricas, la microelectrónica, el uso de plaguicidas y herbicidas en la agricultura y la aplicación de protocolos oncológicos, aportan cantidades significativas de arsénico al medio ambiente. La mayoría de los compuestos arsenicales provenientes de estas fuentes son solubles en agua o permanecen en suspensión hasta depositarse en el suelo por acción de las lluvias, incorporándose, finalmente, a lagos, ríos o aguas subterráneas (Orloff et

al., 2009; Lozna et al., 2007). Por ello, aunque los diversos compuestos arsenicales pueden ingresar al organismo a través del tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y contacto directo con la piel, la principal vía de exposición al arsénico es a través del agua de bebida. Así mismo, debe considerarse que el uso de agua contaminada para la preparación de alimentos aumenta el contenido de arsénico en un 10 a 30% en la mayoría de estos, y en un 200 a 250% en legumbres y granos que absorben el agua de cocción, valores que se incrementan aún más si se considera la concentración de estos compuestos en los cultivos que han sido irrigados con aguas arsenicales, ampliando la exposición a arsénico por vía oral (Mondal et al., 2010).

La considerable evidencia que existe acerca de los efectos tóxicos de los compuestos arsenicales, ha motivado a distintas organizaciones de todo el mundo a establecer límites máximos de arsénico total (orgánico e inorgánico) permitidos en agua de bebida. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las últimas Guías de Calidad para el Agua Potable de 1993 reduce el valor guía de arsénico en agua de 50 µg/L a 10 µg/L, basándose en un estudio realizado por el Foro de Evaluación de Riesgo de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) en 1986 sobre evaluación de riesgo (WHO, 2011). No obstante el Código Alimentario Argentino (CAA) considera un valor máximo de 50 µg/L como límite permitido para el agua denominada potable (ANMAT, 2012).

1.2.2. Efectos sobre la salud

El arsénico es un agente teratogénico, mutagénico y carcinogénico. Los efectos adversos de sus derivados sobre la salud dependen de la dosis y duración de la exposición, según concluye la Agencia sobre Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de los EEUU, en su informe sobre Arsénico en agua de bebida (ATSDR, 2007).

En este sentido, las manifestaciones clínicas ante una intoxicación aguda o subaguda con arsénico pueden variar, dependiendo de la dosis, desde ligeros desórdenes del tracto digestivo hasta el coma y la muerte (por deshidratación severa y shock hipovolémico). Entre los efectos que pueden tener lugar se incluyen alteraciones gastrointestinales (diarrea profusa y sanguinolenta, vómitos, dolor abdominal), hematológicas (anemia normocítica y normocrómica, hemoglobinuria, depresión medular, pancitopenia), cardiovasculares (edema

por daño capilar, caída de la presión arterial, cardiomiopatías), neurológicas (neuropatías periféricas con compromiso de la motilidad de las extremidades, confusión, psicosis, delirio), respiratorias (edema pulmonar agudo y falla respiratoria) y metabólicas (acidosis, hipoglicemia, hipocalcemia), entre otras (Dueñas-Laita et al., 2005; Tournel et al., 2011). Estos efectos agudos o subagudos tiene lugar ante situaciones como intentos de suicidios, homicidios o intoxicación accidental y, dependiendo el grado de daño causado, son potencialmente reversibles una vez finalizada la exposición al compuesto arsenical.

Por otro lado, las lesiones en la piel son los signos primeros y característicos de la exposición sostenida a dosis subletales de arsénico, por lo que se utilizan como indicadores clásicos de diagnóstico de intoxicación crónica (Ahsan et al., 2000), la cual produce además un amplio rango de manifestaciones clínicas que se observan de manera variable en las poblaciones expuestas y que dependen de las variaciones interindividuos, la dosis y la vía de acceso, entre otras (Singh et al., 2007).

De esta manera, las afecciones cutáneas que tienen lugar por intoxicación crónica con arsénico, se caracterizan por la pigmentación o despigmentación puntiforme en “gotas de lluvia” del cuerpo y miembros y la hiperqueratosis de plantas y palmas (Hunt et al., 2014). Otras manifestaciones clínicas observadas de manera variable ocurren a nivel cardiovascular (aterosclerosis, hipertensión, arritmias, enfermedad vascular periférica), neurológico (neuropatía periférica, desórdenes sensoriales y motores, dolor de cabeza, alteraciones del sueño, memoria y concentración), hematológicas (anemia, leucopenia, trombocitopenia), y gastrointestinales (dolor abdominal difuso, dispepsia, hepatomegalia con fibrosis hepática e hipertensión portal. Otros sistemas como el respiratorio, renal, reproductor y endócrino resultan variablemente afectados por los efectos de este metaloide (Yoshida et al., 2004).

Por otra parte, el arsénico inorgánico ha sido clasificado como agente carcinógeno del grupo A por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 2014), dado que la evidencia recolectada por diversos estudios epidemiológicos, principalmente ecológicos, muestra que el consumo de aguas arsenicales aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de piel, hígado, pulmón, vejiga y próstata (Tsuda et al., 1995; Marshall et al., 2007; Hunt et al., 2014). No obstante, la capacidad de metabolización y excreción del arsénico está

determinada por factores genéticos, dietéticos y ambientales que podrían explicar las variaciones interindividuales frente a este riesgo a iguales condiciones de exposición (Ghosh et al., 2008; Hernandez y Marcos, 2008).

Frente a este accionar, el sistema inmune resulta uno de los principales blancos de los efectos deletéreos del arsénico. Los compuestos derivados de este elemento se constituyen como poderosos inmunotóxicos que, mediante diversos mecanismos, comprometen las defensas del organismo promoviendo la adquisición de enfermedades infecciosas y el desarrollo de tumores y otras patologías de base crónica (Acharya et al., 2010).

Sin embargo, aunque los compuestos arsenicales son reconocidos mundialmente por su toxicidad, también presentan una larga historia como agentes terapéuticos. En este sentido, su uso medicinal data del año 400 A.C. al ser empleado por Hipócrates en la elaboración de cremas de uso tópico para el tratamiento de úlceras cutáneas. Luego, a través del tiempo, ha sido parte de la terapia herbal oriental y se ha empleado en la búsqueda de una cura para enfermedades como la malaria, sífilis y psoriasis. En la actualidad, ciertos compuestos arsenicales son empleados en protocolos oncológicos con altos índices de remisión, como en el tratamiento de la leucemia promielocítica (Cicconi y Lo-Coco, 2016), mientras continúan efectuándose ensayos clínicos que permitan ampliar su uso a distintos tipos de tumores (Mann et al., 2009; Emadi y Gore, 2010).

1.2.3. Situación sanitaria en la República Argentina

El nivel elevado de arsénico en el agua de bebida es un serio problema de salud pública en China, India, Bangladés, Taiwán y la mayoría de los países de América del Sur (Tseng, 2009; Naujokas et al., 2013). En este sentido, de acuerdo al valor guía especificado por la OMS, se estima que alrededor de 60 a 100 millones de personas en el mundo se encuentran expuestas a altos niveles de arsénico (Ng, 2005; IARC 2014), de las cuales 14 millones viven en América Latina (ej. Brasil, Chile y Argentina) (Blanco et al., 2006).

En cuanto a la población argentina, se calcula que alrededor de 5 millones de habitantes residen en áreas con aguas arsenicales ($> 10 \mu\text{g/L}$), lo cual representa casi el 9% de la población del país (Blanco et al., 2006). A su vez, las zonas afectadas alcanzan alrededor de 435.000 Km² de superficie y se extienden en un continuo noroeste-sureste desde el

Altiplano hacia la costa atlántica comprometiendo a casi todas las provincias del país, excepto Misiones, Corrientes, Santa Cruz, Neuquén y Tierra del Fuego. El límite meridional corresponde a los ríos Desaguadero y Colorado, y el límite septentrional ha sido fijado en el borde norte del Altiplano, y en los cursos de los ríos Bermejo y Paraná (Bundschuh et al., 2012) y, salvo unas pocas excepciones (minas y fundiciones), el origen del arsénico concentrado en esta zona es natural y está relacionado con el vulcanismo y la actividad hidrotermal asociada de la cordillera de los Andes entre las latitudes 14° y 28° S (Giménez et al., 2000). En este sentido, las aguas superficiales con elevada concentración de arsénico son poco frecuentes y se restringen a las cuencas de La Puna y zonas limítrofes. Por el contrario, las aguas subterráneas afectadas se encuentran distribuidas en amplias áreas de las provincias del norte y centro del país (Bundschuh et al., 2011).

La condición patológica, descrita con anterioridad, que tiene lugar tras la exposición crónica a concentraciones mayores de 10 µg/L a través del agua de consumo diario (por ingesta directa y preparación de alimentos) se conoce en Argentina como HACRE (Hidroarcanisismo Crónico Regional Endémico) (Goyenechea, 1917) y constituye una enfermedad de potencial letalidad y elevada prevalencia en las provincias de Tucumán (Nicolli et al., 2012), Córdoba (Francisca y Carro-Pérez, 2009), Chaco (Blanes et al., 2011), San Juan y La Pampa (O'Reilly et al., 2010), donde el número de casos diagnosticados se correlaciona con la elevada concentración de arsénico a la que están expuestos a través del agua de bebida (10-1000 µg/L).

1.2.4. Toxicocinética

En seres humanos y en la mayoría de las especies animales las formas solubles de arsénico que ingresan por vía oral son absorbidas en un 60-80% por el tracto gastrointestinal. Otra vía de ingresos del arsénico al organismo son a través del tracto respiratorio, donde la absorción promedio oscila alrededor del 30%, dependiendo del tamaño y la solubilidad de las partículas inhaladas y, en menor proporción, por vía dérmica a través del contacto directo (2-6%) (Loffredo et al., 2003).

Los compuestos arsenicales se acumulan principalmente en hígado, bazo, riñones, pulmones y células del tracto gastrointestinal (Kenyon et al., 2008). Numerosas

investigaciones proponen que la biotransformación del arsénico se lleva a cabo mediante una serie de reacciones de oxidación-reducción (redox) que resultan en la conversión del As(V) en As(III) (Németi et al., 2012). Posteriormente una parte de este último es metilado, predominantemente en el hígado, a ácido metilarsónico (MMA) y dimetilarsínico (DMA) (Thomas et al., 2007, Drobna et al., 2010b). Algunos autores sugieren que la enzima metiltransferasa del arsénico (As3MT) cataliza los procesos de metilación, en colaboración con la sulfo-adenosilmetionina (donante de los grupos metilo), y las reacciones de reducción, en presencia de reductores endógenos como el glutatión reducido (GSH), el sistema tiorredoxina y el ácido lipoico (Waters et al., 2004; Li Y et al., 2012; Németi et al., 2012).

Este proceso de reducción seguido de metilación del arsénico ha sido considerado por mucho tiempo como la vía de detoxificación de dichos compuestos. La incapacidad de ciertas especies animales de metabolizar el arsénico inorgánico y la consecuente susceptibilidad a su toxicidad ha servido de fundamento a esta teoría (Vahter, 1999; Drobna et al., 2010a). Incluso, en ciertos microorganismos se ha descrito la capacidad de adaptación o desarrollo de resistencia al arsénico, mediada por la formación de compuestos trimetilados de baja toxicidad (Su et al., 2011). No obstante, existe reciente evidencia que indicaría que ciertos compuestos mono y dimetilados de arsénico trivalente son más reactivos y citotóxicos que sus precursores e incluso que el As(III), lo cual propone a la metilación como una vía de activación (Petrick et al., 2000; Mass et al., 2001; Naranmandura et al., 2011).

Finalmente, la toxicidad de los compuestos arsenicales absorbidos dependería de los procesos de biotransformación que tengan lugar y la velocidad de su eliminación de los tejidos y excreción, principalmente por riñón (Concha et al., 2002, Vahter y Concha 2001). La mayor parte del arsénico urinario se presenta como metabolitos metilados en la siguiente proporción: 10–30% de arsénico inorgánico (sin metilar), 10–20% de MMA, y 60–80% de DMA (Loffredo et al., 2003), aunque estos valores pueden verse modificados dependiendo de la forma química absorbida, el tiempo de exposición, la dosis y la especie animal expuesta (Wu H et al., 2011). El As(V) que no es eliminado se deposita en huesos y dientes, mientras que el As(III) se une a los grupos sulfhidrilos de las proteínas como la queratina, por lo que se acumula en cabello, piel y uñas (Middleton et al., 2016).

1.2.5. Mecanismos de acción

Se han postulado diferentes mecanismos para explicar la toxicidad de As(III) y As(V) respectivamente.

El As(V) compite con el grupo fosfato en la producción de ATP, generando un desacople en la fosforilación oxidativa y formando un éster inestable de arseniato que se hidroliza espontáneamente. Adicionalmente, puede unirse al fosfato de piridoxal e inhibir las reacciones que dependen de él, como la síntesis de dopamina y serotonina. No obstante, su toxicidad como tal es difícil de ponderar dado que, como ya se ha mencionado, una gran parte del As(V) se reduce a As(III) en el organismo (Jomova et al., 2011).

Por su parte, el As(III) interactúa con los grupos sulfhidrilos, por lo que su toxicidad ha sido relacionada con el bloqueo de estos grupos tioles de biomoléculas de naturaleza proteica y esenciales en las funciones celulares. Esta capacidad del As(III) le permite modificar la expresión o interferir en el accionar de enzimas tales como: hemo oxigenasa 1 y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) (Meng et al., 2010), glutatión y tiorredoxina reductasa, glutatión peroxidasa y tranferasa, catalasa y superóxido dismutasa (Rana et al., 2012), entre otras.

Como resultado de esto, se produce una alteración en el balance redox, ya que se ve interrumpida la homeostasis que protege a la célula del estrés oxidativo, con la consecuente acumulación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y azufre) (Bongiovanni et al., 2007). De este delicado balance dependen numerosos procesos de señalización, regulación y supervivencia de las células integradas en tejidos (Trachootham et al., 2008), por lo que su alteración representa el punto común de la mayor parte de los mecanismos de daño celular por arsénico y activa factores de transcripción nuclear que modulan la expresión de genes de proteínas pro/antiapoptóticas y antioxidantes (NF- κ B y Nrf2, respectivamente), con el objeto de modular la capacidad de respuesta celular ante condiciones de estrés oxidativo sostenido (Li et al., 2013). La imposibilidad de restablecer el balance redox y reparar el ADN dañado (por inhibición de la ADN polimerasa, mediada por acción directa del arsénico o de los radicales libres generados), es el mecanismo propuesto en la producción de tumores por intoxicación con arsénico (Kitchin y Wallace, 2008).

De forma simultánea, los compuestos de As(III) inhiben la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), uniéndose y bloqueando a su cofactor (ácido dihidrolipoico), alterando la producción de acetil-CoA y, consecuentemente, al ciclo del ácido cítrico, la cadena respiratoria y la producción de ATP (Samikkannu et al., 2003).

Los efectos tales como peroxidación lipídica, disminución de la concentración intracelular de glutatión, alteraciones en la señalización intra- y extracelular, expresión de citoquinas y apoptosis, son también mecanismos a menudo relacionados con los efectos inmunosupresores del arsénico (Das et al., 2011).

1.3. Fitoquímicos como inmunomoduladores

1.3.1. Generalidades

Los agentes o compuestos capaces de modificar o regular la respuesta inmune de un organismo son denominados inmunomoduladores. Si esta modulación se traduce en una mejora del sistema inmune, se consideran además inmunoestimulantes. En este sentido, el estudio de los fitoquímicos presentes en las plantas y sus efectos sobre este sistema representa un campo promisorio en la búsqueda de nuevos usos farmacológicos de los extractos vegetales y sus componentes bioactivos. No obstante, las propiedades químicas y biomédicas de las plantas nativas de la República Argentina, en particular de la provincia de Córdoba, son escasamente conocidas, dado los acotados estudios que se han abocado a esta temática aunque representan el 31% de la flora medicinal nativa (Goleniowski et al., 2006), existiendo trabajos que describen la capacidad antioxidante de algunos de sus extractos derivados (Soria et al., 2008; Borneo et al., 2009).

Esta necesidad es aún más marcada cuando se focaliza en el potencial inmunomodulador de las especies vegetales autóctonas. Subyace a dicho potencial un fenómeno por el cual los organismos heterótrofos adquieren resistencia al estrés celular tras consumir compuestos bioactivos sintetizados por otro organismo sujeto a estrés ambiental, generalmente vegetal, que se denomina xenohormesis (Surh, 2011). En caso de que esto se traduzca en el mejoramiento de las funciones inmunológicas (Karasawa et al., 2011), se

propone el término inmunoxenohormesis, implicando el aprovechamiento de los productos de la maquinaria biosintética de las plantas (Soria et al., 2010).

1.3.2. Plantas nativas ensayadas

Lantana grisebachii Stuck. (Verbenaceae)

Es un arbusto o subarbusto de 0,50-0,60 metros de altura y ampliamente distribuido en Uruguay y centro y norte de Argentina (Catamarca, Chaco, Córdoba, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Salta, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán).

Esta especie es utilizada en la medicina tradicional como antipirético, antimicrobiano y antiemético, aunque la evidencia científica que confirme su empleo es limitada (Barboza et al., 2009). El aceite obtenido por destilación de *Lantana grisebachii* posee la capacidad de inactivar, de manera efectiva y selectiva, al virus VHS-1 (*Herpes simplex* tipo I) y el virus DENV-1 (virus del dengue) (García et al., 2010). El extracto acuoso de las partes aéreas de esta planta también ha demostrado un potente efecto antioxidante *in vitro*, protegiendo a las células inmunes del estrés oxidativo inducido por arsénico (Soria et al., 2008; Soria et al., 2014).

Aspidosperma quebracho-blanco Schltdl. (Apocynaceae)

Especie que constituye la flora nativa del sur de Bolivia, el oeste del Paraguay y el norte de Argentina. Considerado un árbol que puede alcanzar hasta 20 metros de altura, cuya madera posee múltiples aplicaciones y su corteza contiene sustancias alucinógenas y 26 alcaloides identificados, entre los cuáles se destacan aspidospermina y quebrachamina por su actividad biológica (Deutsh et al., 1994; Mitaine et al., 1996), por lo que en otros países se comercializa sólo con uso medicinal.

En su composición química se han identificado además taninos, alcaloides, saponinas, esteroides y compuestos fenólicos. La bioactividad de estos compuestos ha sido estudiada *in vitro* para fundamentar su empleo en la medicina tradicional como antidiabético, antiasmático, cicatrizante, antipirético, hipolipemiante, desinfectante de heridas,

pediculicida, protector hepático y anticonceptivo (Mitaine-Offer et al., 2002; de Araújo et al., 2018).

Ilex paraguariensis A. St.-Hil. (Aquifoliaceae)

El *Ilex paraguariensis* es un árbol nativo del sur de Sudamérica, utilizado principalmente para la producción de yerba mate. Se encuentra distribuido en Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. En su composición química se han identificados compuestos fenólicos tales como: ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico, rutina, quercetina, kaempferol, cafeína, teobromina y teofilina (Bravo et al., 2007; Bojić et al., 2013, Cittadini et al., 2018). Los extractos acuosos también contienen grandes cantidades de elementos minerales entre los cuales se encuentra el aluminio, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, potasio y zinc (Bragança et al., 2011).

El uso de *Ilex paraguariensis* en la medicina tradicional ha motivado numerosas investigaciones que constatan la variedad de sus propiedades biológicas. Entre éstas se destacan su accionar como antioxidante, antiinflamatoria, digestivo, laxante, diurético, neuroestimulante, vasodilatador y regulador de las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos (Luz et al., 2016; Colpo et al., 2017).

1.3.3. Compuestos fenólicos

A partir de los tejidos de las mencionadas especies, podrían ser obtenidos diferentes compuestos bioactivos, entre los cuales los fenoles presentan un gran potencial inmunomodulador. Estas biomoléculas constituyen el mayor grupo de fitoquímicos con actividad antioxidante y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Pueden encontrarse libres o conjugados con otras moléculas orgánicas y van desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos altamente polimerizados con pesos moleculares de más de 30.000 Da. (Bravo, 1998), por lo que pueden clasificarse en, por lo menos, 10 grupos diferentes dependiendo de su estructura química básica (Tabla 1). Los flavonoides, que constituyen el grupo más importante, a su vez pueden ser subdivididos en 13 clases, con más de 5000 compuestos descritos.

Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química básica (Bravo,1998; Tsao, 2010).

Clase	Estructura Química Básica
FENOLES SIMPLES	C ₆
BENZOQUINONAS	C ₆ -
ÁCIDOS FENÓLICOS	C ₆ -C ₁
ACETOFENONAS	C ₆ -C ₂
ÁCIDOS FENILACÉTICOS	C ₆ -C ₂
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS	C ₆ -C ₃
FENILPROPENOS	C ₆ -C ₃
CUMARINAS, ISOCUMARINAS	C ₆ -C ₃
CROMONAS	C ₆ -C ₃
NAFTOQUINONAS	C ₆ -C ₄
XANTONAS	C ₆ -C ₁ -C ₆
ESTILBENOS	C ₆ -C ₂ -C ₆
ANTRAQUINONAS	C ₆ -C ₂ -C ₆
FLAVONOIDES	C ₆ -C ₃ -C ₆
LIGNANOS, NEOLIGNANOS	(C ₆ -C ₃) ₂
LIGNINAS	(C ₆ -C ₃) ₂

Los fenoles, principalmente los flavonoides, reaccionan con los radicales libres y quelantes de iones metálicos (Russo et al., 2000) que son capaces de catalizar la peroxidación lipídica. Otros autores se refieren además a la capacidad que estos fitoquímicos poseen de inhibir oxidasas, como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa, evitando la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) *in vivo*. Adicionalmente, se ha podido conocer que inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes tales como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Khettal et al., 2017).

Por todo ello, la modulación de la respuesta inmunitaria a través del consumo oral de alimentos fuentes de fenoles vegetales resulta un campo promisorio en la prevención, principalmente, de patologías degenerativas y de base inflamatoria (Magrone et al., 2012), donde el sistema inmunológico tiene un rol determinante en el estado de salud y la longevidad (Baeza et al., 2010). En este sentido, se ha recomendado que una ingesta suficiente en polifenoles tendría gran valor sanitario en función de sus propiedades

antioxidantes e inmunorreguladoras (Brückner et al., 2012). Otro efecto de interés es su potencial como quimiopreventivos en procesos mórbidos derivados de la exposición ambiental a agentes nocivos, tales como los contaminantes, sean de origen natural (ej.: arsénico) o antrópico (pesticidas) (Nasreddine y Parent-Massin, 2002; Chow et al., 2007). Este campo emergente surge debido al manejo subóptimo de los mencionados problemas de salud por parte de la medicina clásica. En este contexto, los fitoquímicos podrían ser utilizados a partir de sus múltiples mecanismos de acción (antioxidación, disrupción de cascadas de señalización proinflamatorias y modulación de la producción de citoquinas) (Clarke y Mullin, 2008; Chiva-Blanch et al., 2012).

Uno de los puntos centrales en el uso de polifenoles como quimiopreventivos es la adecuada incorporación de los mismos y su distribución en tejidos blancos de su actividad farmaconutricional (Cherniack, 2012), la cual depende de numerosas interacciones con moléculas alimentarias y tisulares (Ferruzzi et al., 2012). Consecuentemente, su biodisponibilidad en órganos hemolinfáticos es de estudio obligado, principalmente a partir de la ingesta de extractos derivados de infusiones, ya que son la forma de consumo natural en humanos más frecuente, junto con los alimentos ricos en compuestos fenólicos (Kim et al., 2003). Esta aclaración es válida debido a que la mayor parte de los estudios cinéticos en el área utilizan compuestos o formas farmacéuticas modificadas artificialmente para aumentar su absorción (Le Bourvellec y Renard, 2012; Vitaglione et al., 2012). Dado que la respuesta de las células inmunitarias a los polifenoles dietarios dependería de la regulación que éstos median sobre el estado oxidativo de las mismas (Suzuki et al., 2010), resulta relevante evaluar su incorporación tisular (Kawai, 2011), para confirmar *in vivo* hallazgos *in vitro* aislados y establecer recomendaciones nutricionales y médicas (Brambilla et al., 2008).

HIPÓTESIS

El uso de extractos acuosos de plantas nativas incrementaría la resistencia de órganos, tejidos y células del sistema inmune, frente a tóxicos ambientales como el arsénico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer la capacidad xenohormética de extractos acuosos de plantas nativas frente a inmunotoxicidad inducida por arsénico.

Objetivos Específicos

- Determinar el contenido fenólico de extractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebracho-blanco* e *Ilex paraguariensis* y su biodisponibilidad por ingesta en timo, bazo y sangre.
- Establecer el efecto del consumo de fitoextractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebracho-blanco* e *Ilex paraguariensis* sobre el balance redox en timo, bazo y sangre.
- Establecer el efecto xenohormético en esplenocitos de los fitoextractos seguros frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.
- Determinar cambios oxidativos en sangre, bazo y timo asociados al uso del fitoextracto seguro y bioactivo en toxicidad aguda inducida por arsénico.
- Establecer las vías metabólicas involucradas en la bioactividad del fitoextracto seleccionado frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Equipamiento

La infraestructura, los servicios e instalaciones generales y el equipamiento, incluyendo un multilector de microplacas Multi-GloMax® (Promega Corp., EE.UU.), necesarios para el desarrollo de la presente Tesis fueron dispuestos por el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA, UNC-CONICET), el cual dispone de bioterio para el cuidado de animales y laboratorios de cultivo celular y bioquímicos, además de cámaras frigoríficas de mantenimiento.

Por su parte, la determinación de arsénico se realizó en el Laboratorio de Técnicas por Fluorescencia No Convencionales de la Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación de la Universidad Nacional de Córdoba y la activación del NF-κB se midió en el Laboratorio AVIDIN Ltd. de Szeged, Hungría.

2.2. Metodología

2.2.1. Contenido fenólico en extractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebracho-blanco* e *Ilex paraguariensis* y su biodisponibilidad por ingesta en timo, bazo y sangre.

2.2.1.1. Obtención de fitoextractos a partir de infusiones

Se recolectaron en la zona montañosa de la región fitogeográfica chaqueña en el centro de Argentina (coordenadas GPS: -31,28, -64,44), durante el verano, las partes aéreas de *Lantana grisebachii* (LG) y *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB), mientras que las correspondientes de *Ilex paraguariensis* (IP) fueron de origen comercial a partir de cultivo agroecológico. Para ello, se contó con la autorización gubernamental correspondiente (Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina).

Las muestras recolectadas y desecadas en ambiente oscuro y seco fueron luego pulverizadas y maceradas en agua potable inicialmente a 95°C (relación 1 g en 10 mL). Estas infusiones se mantuvieron por 1 hora en oscuridad bajo agitación constante hasta alcanzar temperatura ambiente, tras lo cual fueron centrifugadas y filtradas.

Se cuantificó el peso seco del extracto de cada infusión, liofilizando una alícuota de la misma (liofilización: 24 horas, al vacío a $< -50^{\circ}\text{C}$) y pesando el correspondiente residuo seco de acuerdo al volumen inicial.

2.2.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos en fitoextractos

El contenido fenólico de los extractos vegetales obtenidos fue analizado por espectrofotometría a partir de la técnica de Folin-Ciocalteu (Ait Baddi et al., 2009). Para lo cual, 25 μL de cada extracto reaccionaron en oscuridad por 30 minutos a 37°C con 25 μL de solución de Folin 2 N, 150 μL de agua destilada y 50 μL de una solución saturada de bicarbonato de sodio. Luego, se midió absorbancia a 750 nm en el multilector y se procedió al cálculo del contenido de compuestos fenólicos por interpolación de las lecturas obtenidas con una curva de estándar ($R^2 > 0,98$) realizada con 0.01- 18.75 μg de ácido gálico (Laboratorio Anedra, Argentina) y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (EAG mg/g).

2.2.1.3. Ensayo de consumo oral de los fitoextractos

Se emplearon ratones Balb/c de 2 meses de edad y de ambos sexos, de acuerdo con los principios y normas internacionales para el uso de animales de laboratorio y sus cuidados aceptados y reglamentados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de Laboratorio (CICUAL). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándares de bioterio con alimentación e hidratación *ad libitum*, con dieta comercial (Cargill SACI, Argentina) y agua potable (Aguas Cordobesas SA, Argentina), respectivamente.

Experimentalmente, se conformaron 4 grupos de $n \geq 3$ (por cada sexo) que recibieron, por vía oral durante 30 días, 0 mg/Kg (agua corriente sin extracto) o 100 mg/Kg de extracto seco de LG, AQB o IP respectivamente, los cuales fueron administrados diariamente con pipeta en un volumen único de 50 μL de acuerdo a la capacidad bucal murina. Durante este período se controló, semanalmente, el estado clínico general y los cambios ponderales de cada individuo (ANEXO 2).

Para su sacrificio, los animales fueron anestesiados por inhalación de isoflurano (Piramal Healthcare, Reino Unido), procediéndose así a su sangrado a blanco mediante punción cardíaca. Seguidamente, en la autopsia de cada individuo, se obtuvieron además

bazo y timo. Los órganos fueron pesados y homogeneizados en 2 mL de solución salina isotónica, mientras que la sangre se mantuvo anticoagulada con solución comercial de heparina sódica. Cada muestra líquida así conformada fue dividida en dos alícuotas, previa medición del contenido proteico empleando un kit comercial (Wiener Lab Group, Argentina), para estandarizar las variables que posteriormente se estudiaron. Una de las alícuotas no recibió procesamiento adicional (homogenato), mientras que la otra fue tratada con metanol y ácido tricloroacético al 50% (relación respectiva de volúmenes 4:6:0,5) a 50°C por 30 minutos (solventes provistos por Cicarelli, Argentina), a fin de obtener un sobrenadante por centrifugación a 10000 g durante 1 minuto (sobrenadante). Finalmente, todas las muestras conformadas fueron conservadas a -18°C hasta su análisis.

2.2.1.4. Cuantificación de compuestos fenólicos tisulares

El contenido fenólico de las muestras animales fue determinado en el sobrenadante ácido-metanólico de las mismas utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu descrita en el punto 2.2.1.2. Los resultados fueron expresados como μg de equivalentes de ácido gálico por mg de proteína contenida en la muestra (EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).

2.2.1.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de las distintas determinaciones se expresaron como media \pm error estándar (EE), calculados con el programa estadístico InfoStat 2018 (estadística descriptiva). Para establecer el efecto en las muestras animales, se emplearon los correspondientes modelos de ANAVA, seguidos por la prueba de Fisher con dos niveles de significancia ($p < 0,1$ y $p < 0,05$) (InfoStat, 2018).

2.2.2. Efecto del consumo de fitoextractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebracho-blanco* e *Ilex paraguariensis* sobre el balance redox en timo, bazo y sangre.

2.2.2.1. Condiciones experimentales

Con el objeto de analizar el posible accionar de los extractos ensayados sobre la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN respectivamente) en los tejidos de interés se efectuaron las determinaciones detalladas a continuación en muestras

de bazo, timo y sangre (homogenatos y sobrenadantes) provenientes de animales bajo las condiciones descritas en el punto 2.2.1.3.

2.2.2.2. Medición de marcadores oxidativos

Anión superóxido (SO)

Se analizó espectrofotométricamente en los sobrenadantes por tinción con nitroazul de tetrazolio (1 mg/mL). Las muestras fueron mezcladas con el colorante (9:1 v/v) e incubadas durante 30 min en oscuridad a 37°C. Posteriormente, se añadió a dichas mezclas dimetilsulfóxido e hidróxido de potasio 2 M (2:1:1 v/v/v) (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos), antes de leer absorbancia a 600 nm (Marchesino et al., 2017). Las concentraciones de SO fueron calculadas como porcentajes de absorbancia respecto a control tras restar la lectura blanco y estandarizar por el contenido proteico inicial (%).

Peróxidos acuosos y lipídicos (HP y LP)

Estos compuestos se determinaron en homogenatos por su capacidad de reaccionar con naranja de xilenol. El procedimiento consistió en incubar a temperatura ambiente y por 30 minutos la muestra con una solución cromógena (10:100 v/v). Para HP, dicha solución consistió en sulfato amonio ferroso 25 mM en ácido sulfúrico 2,5 M reconstituido con sorbitol 100 mM y naranja de xilenol 125 µM. Para LP, el sulfato amonio ferroso fue reconstituido con hidroxitolueno butilado 4 mM y naranja de xilenol 125 µM en metanol al 90% (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos). Ambos fueron medidos a 540 nm y calculados como porcentajes tras restar el blanco correspondiente y estandarizar por el contenido proteico (Soria et al., 2008).

Nitritos

La producción de óxido nítrico (NO) fue evaluada indirectamente midiendo nitritos (producto estable de la reacción de NO con oxígeno) en homogenatos por la reacción de diazotización de Griess (Green et al., 1982). Se mezcló una parte de muestra con iguales partes de los reactivos de Griess A (dihidrocloruro de naftil-etilendiamina al 0.1%) y B (sulfanilamida al 1% en HCl 0.1 N) (1:1:1 v/v/v). La lectura en espectrofotómetro se efectuó

tras 15 minutos a 550 nm y la concentración de nitritos fue calculada por comparación con una curva estándar realizada con nitrito de sodio (0-100 μM) y los resultados fueron expresados como $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteínas.

2.2.2.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de las distintas determinaciones se expresaron como media \pm error estándar (EE). Para su análisis, se procedió de acuerdo a lo detallado en el punto 2.2.1.5.

2.2.3. Efecto xenohormético en esplenocitos de los fitoextractos seguros frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.

2.2.3.1. Desarrollo del modelo experimental

Tras haber identificado extractos de uso seguro para emplearlos en tratamientos *in vivo*, se procedió a evaluar su potencial protector frente a un agresor de origen ambiental (arsénico) en un modelo animal desarrollado a tal efecto.

Para ello, en primera instancia, tras revisar la bibliografía disponible, se definió la DL50 ip (dosis letal 50 intraperitoneal) de arsenito de sodio (NaAsO_2 , forma molecular disponible de arsénico trivalente con mayor toxicidad; Laboratorio Anedra, Argentina) en 19 mg/Kg para ratones (Hogan y Eagle, 1944), siendo ésta la cantidad mínima de una sustancia capaz de provocar la muerte de un 50% de animales de prueba dando cuenta de la toxicidad aguda del producto en su utilización. Con este valor y un valor medio (9,5 mg/Kg), se inyectaron ratones Balb/c de ambos sexos y 2 meses de edad por vía intraperitoneal (grupos de $n \geq 3$) y se procedió a una curva de dosis-respuesta que se sometió a análisis por regresión lineal, considerando como tal la viabilidad de células esplénicas (esplenocitos) tras 30 minutos (punto final en que se instauraba clínicamente sopor y se procedía con el sacrificio y la autopsia), tiempo durante el cual fueron mantenidos con hidratación oral *ad libitum*. Los controles recibieron 0 mg/Kg, empleándose solución fisiológica para reemplazar el volumen de líquido administrado. La aplicación intraperitoneal se realizó con jeringas de 1 mL (0,50x15 mm -25 G 5/8"-):

Machos

- Grupo 1: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (control).
- Grupo 2: 9,5 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 3: 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.

Hembras

- Grupo 1: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (control).
- Grupo 2: 9,5 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 3: 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.

El análisis de los datos por regresión lineal indicó, en los animales machos, un descenso de la viabilidad celular dependiente de la concentración de arsénico ($R^2=0,7$; $p<0,0001$), siendo significativa estadísticamente la respuesta de la DL50 respecto a control ($p<0,05$). Esto no fue observado en las hembras ($R^2=0,1$; $p=0,4659$), por lo que se avanzó en la determinación del modelo experimental con dicha dosis en machos a partir de su capacidad de ofrecer resultados predecibles, brindando la posibilidad de emplear esta característica en el desarrollo de una herramienta diagnóstica.

Posteriormente, habiendo seleccionado los fitoextractos seguros (AQB e IP), se procedió a evaluar el tiempo necesario de su administración por vía oral para que las moléculas contenidas en ellos se encontraran biodisponibles al momento de la inyección de arsenito de sodio (Farah et al., 2008; Li G et al., 2012), para ello se conformaron nuevamente grupos de ratones Balb/c de $n\geq 3$ a los cuales se les administró 1 y 3 horas antes por vía oral los extractos de AQB e IP en dosis de 0, 50 y 100 mg/Kg, con pipeta en un volumen único de 50 μ L de acuerdo a la capacidad bucal murina.

- Grupo 1: 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 2: 50 mg/Kg AQB (1 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 3: 50 mg/Kg AQB (3 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 4: 100 mg/Kg AQB (1 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 5: 100 mg/Kg AQB (3 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 6: 50 mg/Kg IP (1 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 7: 50 mg/Kg IP (3 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 8: 100 mg/Kg IP (1 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo 9: 100 mg/Kg IP (3 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.

Así, tras analizar nuevamente los datos recabados (viabilidad de esplenocitos), se observó una respuesta tiempo-dependiente ($R^2=0,6$; $p=0,0052$), con efectos significativos al administrarse los fitoextractos 3 horas previas a la inyección intraperitoneal de arsenito de sodio ($p<0,05$). No obstante, los resultados obtenidos con las dosis de 100 mg/Kg de AQB e IP (más 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip), mostraron un efecto deletéreo sobre la viabilidad de células esplénicas ($p<0,05$) superior al determinado por el uso aislado de arsenito de sodio, razón por la cual se decidió utilizar los fitoextractos de AQB e IP en monodosis de 50 mg/Kg/día administradas 3 horas previas a la inyección intraperitoneal del agente agresor.

2.2.3.2. Aplicación del modelo experimental

Tras haber establecido las condiciones experimentales óptimas, se constituyeron 6 grupos de ratones Balb/c machos de 2 meses ($n\geq 3$ por cada grupo), mantenidos bajo condiciones estándares de bioterio, según lo ya descrito, hasta el momento de la intervención. Así, los animales recibieron 50 mg/Kg de extracto de AQB o IP, y 0 mg/Kg (control que recibió un volumen equivalente de agua, 50 μL). Luego de 3 horas, fueron inyectados intraperitonealmente, previa anestesia con isoflurano, con 100 μL de solución fisiológica (control) o 19 mg/Kg de NaAsO_2 (en 100 μL de solución acuosa). Durante todo el ensayo, los animales fueron mantenidos con hidratación *ad libitum*.

- Grupo control: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO_2 (control).
- Grupo arsénico: 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip.
- Grupo AQB: 50 mg/Kg AQB (3 horas previas) + 0 mg/Kg de NaAsO_2 ip.
- Grupo AQB + arsénico: 50 mg/Kg AQB (3 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip.
- Grupo IP: 50 mg/Kg IP (3 horas previas) + 0 mg/Kg de NaAsO_2 ip.
- Grupo IP + arsénico: 50 mg/Kg IP (3 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip.

El sacrificio de los animales (por sangrado a blanco) y su posterior autopsia, se llevaron a cabo una vez transcurridos los 30 minutos desde la administración de la inyección intraperitoneal, tiempo durante el cual se observó la evolución clínica de cada individuo. Se obtuvo sangre por punción cardíaca en los animales anestesiados y, luego, se extrajeron timo y bazo, para su posterior procesado y análisis. Este último fue dividido en dos mitades, una

de las cuales fue empleada para el cultivo primario de sus esplenocitos. También se extrajo riñón que fue reservado para determinar la excreción de arsénico (ANEXO 3).

2.2.3.3. Cultivo primario de esplenocitos

Preparación de materiales

Se reconstituyó medio de cultivo RPMI-1640 sin rojo fenol de la siguiente manera: 10 g de medio (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.), 2 g de bicarbonato de sodio, 10 mg de ciprofloxacina, 3,25 µL de mercaptoetanol y csp 1 L de agua mili-Q, llevando a pH de 7,5 con una solución de HCl 0,1 N. Luego, fue esterilizado por filtración con poro de 0,22 µm y conservado en alícuotas de 100 mL a 4°C. Cada una fue completada con 10 mL de suero fetal bovino inmediatamente antes de ser empleada.

La solución hemolítica, necesaria para eliminar los eritrocitos de la suspensión, contenía 8,3 g/L de solución de Tris 0,01 M, llevando a pH de 7,5 con HCl 0,1 N. Los reactivos provistos por Sigma-Aldrich Co., EE.UU.

Cultivo celular

Manteniendo condiciones de máxima asepsia, cada muestra esplénica proveniente de los animales ensayados de acuerdo a lo desarrollado en los apartados 2.2.3.1. y 2.2.3.2., fue disgregada mecánicamente dentro de 2 mL de solución hemolítica, entre las superficies esmeriladas de dos unidades de portaobjetos. La suspensión así constituida fue cuidadosamente recogida y colocada en un tubo cónico estéril. Tras 5 minutos, se adicionaron 8 mL de medio de cultivo completo y se centrifugó 5 minutos a 2500 g, para recuperar el precipitado, que luego fue resuspendido en 10 mL del medio. Finalmente, se procedió al conteo de células en cámara de Neubauer de acuerdo a la práctica usual, expresando el conteo como células/µL. Las suspensiones celulares fueron mantenidas a 37°C en ambiente estéril con 5% de CO₂ hasta su análisis.

2.2.3.4. Determinación de viabilidad

Dada la capacidad de metabolizar resazurina de las células viables, se preparó una solución de dicho colorante de 0,05 mg/mL, que luego se incorporó, en placa de 96 pozos, a

la suspensión de esplenocitos obtenida de cada individuo (1:100 v/v). Se incubó por 5 horas a 37°C y se midieron los valores de absorbancia a 600 nm. Posteriormente, los niveles de viabilidad celular se calcularon como porcentaje de absorbancia respecto del grupo control (%) luego de restar el blanco correspondiente y estandarizar las lecturas obtenidas por el número de células contenido en cada suspensión (Strotmann et al., 1993).

2.2.3.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de las distintas determinaciones se expresaron como media \pm error estándar (EE). Para su análisis, se procedió de acuerdo a lo detallado en el punto 2.2.1.5.

2.2.4. Cambios oxidativos en sangre, bazo y timo asociados al uso del fitoextracto seguro y bioactivo en toxicidad aguda inducida por arsénico.

2.2.4.1. Condiciones experimentales

Consecuentemente con los resultados derivados del cribado realizado de acuerdo a lo detallado en el apartado 2.2.3, se escogió el extracto acuoso de IP para continuar los ensayos, dada su bioactividad frente a toxicidad aguda por arsénico. Con el objeto de ensayar los cambios que pudieran haberse dado en los parámetros de estrés oxidativo, por exposición a arsénico y el uso concomitante de dicho extracto en una monodosis de 50 mg/Kg, se efectuaron las determinaciones que se detallan en 2.2.4.2. y 2.2.4.3. sobre bazo (la mitad restante), timo y sangre obtenidos de los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂.
- Grupo arsénico: 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo IP: 50 mg/Kg IP (3 horas previas) + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo IP + arsénico: 50 mg/Kg IP (3 horas previas) + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.

Para ello, inicialmente, cada muestra fue dividida y procesada en dos alícuotas como se realizó en el punto 2.2.1.3 (homogenatos y sobrenadantes, estandarizados por su contenido proteico inicial medido con kit comercial).

2.2.4.2. Medición de compuestos bioactivos

Determinación de arsénico

Con el objeto de confirmar la presencia/ausencia de arsénico en el tejido ensayado se procedió al análisis de las muestras de bazo y riñón (dado su rol en la excreción de este mineral) por fluorescencia de rayos X. Para ello se colocó cada muestra, previa fijación de los homogenatos en soporte, en un portamuestra automatizado con tres movimientos ortogonales de 6 micrones de precisión. Posteriormente, cada una de ellas fue irradiada con rayos X a partir de un tubo de 3kW de potencia con foco lineal de 12mm×0,4mm y ánodo de molibdeno (modelo PW1830 – Philips, Argentina). La obtención de datos se realizó a través de un detector portátil dispersivo en energía de cristal de silicio (MOXTEK Inc., EE.UU.).

Cuantificación de compuestos fenólicos tisulares

El contenido fenólico en bazo, timo y sangre fue determinado en el sobrenadante ácido-metanólico de las muestras utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu descrita en el punto 2.2.1.2. Los resultados fueron expresados como μg de equivalentes de ácido gálico por mg de proteína contenida en la muestra (EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).

Cuantificación de hierro

Se procedió a la determinación de la concentración de hierro en los homogenatos de timo y bazo midiendo espectrofotométricamente a 570-640 nm la formación de un complejo azul-violáceo a partir de los cationes ferrosos con 3-(2-pyridyl)-5,6-bis-2(sulfofuril)-1,2,3-triazina (Ferene) (Ferroquant, GT Lab, Argentina). Los resultados fueron expresados como μg hierro por mg de proteína, para lo cual se empleó como estándar una solución de sales ferrosas 100 $\mu\text{g}/\text{dL}$ provista por el kit comercial.

2.2.4.3. Medición de marcadores oxidativos

Peróxidos acuosos y lipídicos (HP y LP)

Se reiteraron los procedimientos descritos y fundamentados en el punto 2.2.2.2., sobre las muestras de bazo, timo y sangre provenientes de los grupos detallados en el apartado 2.2.4.1.

Productos avanzados de oxidación proteica (PAOP)

Adicionalmente, con el objeto de confirmar si el estrés oxidativo se traducía en daño macromolecular, se midieron PAOP sobre las mismas muestras mediante espectrofotometría a 340 nm en condiciones ácidas y en presencia de yoduro de potasio, siguiendo la transformación de los iones I^- a I_2 que provocan los PAOP y utilizando como patrón de referencia a cloramina T. Para lo cual se colocó, en placa de 96 pozos, la muestra junto con solución PBS 0,015 M, KI 1,16 M y ácido acético en relación 4:16:1:2. La concentración de PAOP fue calculada de acuerdo a la ecuación de la curva de estándar y expresada como mg de equivalentes de cloramina T por mg de proteína (Matteucci et al., 2001, Rugale et al., 2007).

2.2.4.4. Medición de grupos sulfhidrilos

Se consideró la medición de esta variable ya que, en general, todo el arsénico inorgánico es transformado a arsénico trivalente al ingresar a la célula, el cual es altamente reactivo e interacciona con los grupos tioles de las proteínas y péptidos como el glutatión (que participa en el mantenimiento del balance redox) o el ácido alfa lipóico o tióico (cofactor de enzimas involucradas en la actividad mitocondrial) bloqueándolos (Meng et al., 2010; Rana et al., 2012).

En este sentido, para determinar los grupos sulfhidrilos (-SH) libres en las muestras se utilizó el reactivo de Ellman, 5, 5'-ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzoico) (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.), también conocido como DTNB, el cual reacciona con un grupo -SH de las proteínas en condiciones alcalinas suaves (pH 7-8) para producir un disulfuro mixto y ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB), un producto de color amarillo intenso medible a 412 nm (Boyne y Ellman, 1972). La técnica necesitó ser desarrollada y puesta a punto y, para ello, se preparó una solución madre 10 mM de DTNB empleando DMSO como solvente, la cual se diluyó 100 veces con Tris-HCl 0,1M pH 7,5 para obtener una solución de trabajo 0,1 mM cada vez que se lo requirió. De esta manera, 190 μ L de la solución diluida se incorporaron, en placa de 96 pozos, a los homogenatos de muestras (10 μ L) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente previo a la medición de absorbancia en espectrofotómetro. Posteriormente, la determinación de los grupos sulfhidrilos libres se calculó como mg N-acetilcisteína por mg de

proteína, para lo cual se restaron los blancos correspondientes a las lecturas obtenidas y se interpolaron los valores estandarizados por proteínas contenidas en la muestra con una curva de estándar ($R^2 > 0,97$) realizada con 0,032- 1,02 μg de N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.).

2.2.4.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de las distintas determinaciones se expresaron como media \pm error estándar (EE). Para su análisis, se procedió de acuerdo a lo detallado en el punto 2.2.1.5.

2.2.5. Vías metabólicas involucradas en la bioactividad del fitoextracto seleccionado frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.

2.2.5.1. Condiciones experimentales

Con el objeto de establecer los posibles mecanismos de acción por los cuales el extracto acuoso de IP (50 mg/Kg) presenta un efecto sobre los esplenocitos de los animales expuestos a intoxicación aguda por arsénico que deriva en la sobrevida de los mismos, se procedieron a efectuar las determinaciones de las variables que se desarrollan a continuación sobre la suspensión celular obtenida con anterioridad (apartado 2.2.3.3.).

Posteriormente, para confirmar los resultados hallados, se repitieron las condiciones experimentales del punto 2.2.3.2. con ácido 5-cafeoilquínico o ácido clorogénico (AC - compuesto fenólico identificado en mayor proporción en el extracto acuoso de IP) (Cittadini et al., 2018) introducido en los animales en una monodosis oral de 20 mg/Kg, 3 horas previas a la inyección intraperitoneal con la DL50 de arsenito de sodio. Se obtuvo la suspensión de esplenocitos de acuerdo al procedimiento detallado en 2.2.3.3. y se procedió a medir su potencial mitocondrial como se describirá en el punto 2.2.5.6.

2.2.5.2. Medición de glucosa

Se determinó la concentración de glucosa en las suspensiones de células esplénicas, empleando para ello las soluciones provistas en el Glucosa Liquid Plus kit por Sigma-Aldrich Co., EE.UU. y determinando la intensidad de color (midiendo absorbancia a 505 nm) que

tiene lugar con la formación de una quinomina a partir del peróxido de hidrógeno, liberado por oxidación de la glucosa contenida en las muestras, en presencia de peroxidasa, 4-aminofenazona (4-AF) y fenol. Los resultados obtenidos fueron expresados como μg glucosa por célula, tras restar el blanco correspondiente y estandarizar las lecturas obtenidas por el número de células contenido en cada suspensión.

2.2.5.3. Medición de lactato

La determinación de lactato contenido en las suspensiones celulares obtenidas, fue considerada por ser éste un intermediario del metabolismo anaeróbico de los hidratos de carbono. Para ello se empleó el kit comercial Lactate provisto por Wiener Lab Group, Argentina, que emplea la reacción de oxidación del lactato a partir de la enzima lactato oxidasa; a partir de ésta el peróxido de hidrógeno liberado genera un complejo cromógeno por acción de la peroxidasa, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de L-lactato contenido en la muestra y puede determinarse midiendo absorbancia a 540-550 nm. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de área respecto al grupo control (%), tras restar el blanco correspondiente y estandarizar las lecturas obtenidas por el número de células contenido en cada suspensión.

2.2.5.4. Medición de anión superóxido (SO)

Se consideró la medición de esta variable por ser el anión superóxido un marcador de la actividad de las vías metabólicas aeróbicas. Para su cuantificación en los esplenocitos se repitió el procedimiento descrito en el punto 2.2.2.2. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de área respecto al grupo control (%), tras estandarizar por el número de células contenido en cada suspensión.

2.2.5.5. Medición de grupos sulfhidrilos

Se cuantificaron los grupos sulfhidrilos libres en las suspensiones de esplenocitos a partir del reactivo de Ellman utilizando el protocolo descrito en el punto 2.2.4.4. Los resultados obtenidos fueron expresados como mg N-acetilcisteína por célula.

2.2.5.6. Medición de NF-κB activo

Un factor intracelular clave en la respuesta inflamatoria es el factor nuclear kappa B (NF-κB), el cual se libera de su inhibidor (IκB) y se transloca al núcleo donde estimula la expresión de todos los productos génicos relacionados con la respuesta inflamatoria, como las citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-6, IL-8), la NADPH oxidasa, etc (Marcos, 2011).

Por ello, como ensayo complementario se determinó la activación del NF-κB, a partir de IP, por ser éste un biomarcador con un rol central en el desarrollo de los mecanismos de resistencia a estrés oxidativo celular y apoptosis (Wang et al., 2008). Su expresión fue determinada por luminiscencia y empleando para ello células transfectadas, las cuales fueron sembradas en placa de 96 pozos junto con 150 µL de medio (RPMI-1640 suplementado con 10% de FCS y 200 µg/ml de G-418) e, inicialmente, incubadas en estufa de cultivo por 24 horas. Posteriormente, se procedió a lavar las mismas con solución PBS y se indujo la expresión de NF-κB con 0,5 µg/mL de lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) en 90 µL y 10 µL de volumen final a la hora 0 y 1 respectivamente. Transcurridas las 5 horas posteriores, las células fueron 3 veces lavadas con solución PBS y luego lisadas con 30 µL de buffer de lisis 0,1%. 10 minutos después se procedió a medir la luminiscencia basal y se añadieron 30 µL de D-luciferina (Promega Corp., EE.UU.) a las células lisadas. Las señales luminiscentes emitidas por éstas fueron medidas con luminómetro (Perkin Elmer, E.E.U.U) y se analizaron los resultados obtenidos y expresados como porcentaje de área respecto a control.

2.2.5.7. Determinación del potencial mitocondrial

Se procedió a la medición del potencial de membrana como indicador de la función mitocondrial en los esplenocitos obtenidos por cultivo primario de los bazo de los animales que conformaron los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control: 0 mg/Kg de ácido clorogénico + 0 mg/Kg de NaAsO₂.
- Grupo arsénico: 0 mg/Kg de ácido clorogénico + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.
- Grupo AC: 20 mg/Kg de ácido clorogénico + 0 mg/Kg de NaAsO₂.
- Grupo AC + arsénico: 20 mg/Kg de ácido clorogénico + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip.

El yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6(3), Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) es una sonda fluorescente verde, lipofílica, capaz de marcar membranas y otras estructuras hidrofóbicas. En bajas concentraciones, este colorante tiñe selectivamente las membranas mitocondriales de las células vivas, dependiente del potencial transmembrana, por lo que su reducción implica menor viabilidad celular como evento temprano de apoptosis (Hossain et al., 2000).

Se incubaron a 37°C por 15 minutos en oscuridad 148 µL de suspensión celular con 2 µL de reactivo preparado en dimetilsulfóxido (concentración final del fluoróforo de 40 nM), para luego leer la absorbancia a 485 nm. Tras estandarizar por conteo celular, los resultados se expresaron como porcentaje de área respecto al grupo control (%).

2.2.5.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de las distintas determinaciones se expresaron como media \pm error estándar (EE). Para su análisis, se procedió de acuerdo a lo detallado en el punto 2.2.1.5.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Contenido fenólico en extractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebracho-blanco* e *Ilex paraguariensis* y su biodisponibilidad por ingesta en timo, bazo y sangre.

3.1.1. Contenido de compuestos fenólicos en fitoextractos

- Fenoles totales en LG: $10,23 \pm 0,43$ EAG mg/g de extracto seco.
- Fenoles totales en AQB: $2,57 \pm 0,14$ EAG mg/g de extracto seco.
- Fenoles totales en IP: $21,77 \pm 1,37$ EAG mg/g de extracto seco.

3.1.2. Evaluación ponderal de los individuos

Peso corporal

Tras analizar estadísticamente los pesos recogidos semanalmente de los individuos en experimento, se observó que las variaciones de los valores promedios con sus respectivos errores entre los diversos grupos experimentales y sus respectivos controles, no son significativas ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2: Peso corporal semanal de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media (g) +/- E.E. (n>3).

HEMBRAS				
Semanas	Tratamiento			
	Control	LG	AQB	IP
0	$19,02 \pm 1,28$	$20,38 \pm 2,30$	$18,42 \pm 0,53$	$17,98 \pm 0,82$
1	$18,17 \pm 0,95$	$17,42 \pm 1,36$	$19,00 \pm 0,47$	$17,42 \pm 0,88$
2	$20,83 \pm 0,64$	$20,08 \pm 0,55$	$18,58 \pm 0,47$	$19,00 \pm 0,89$
3	$21,33 \pm 0,33$	$21,50 \pm 0,76$	$20,67 \pm 0,17$	$20,33 \pm 0,44$
4	$21,00 \pm 0,29$	$21,67 \pm 0,88$	$19,67 \pm 0,17$	$20,17 \pm 0,60$

MACHOS				
Semanas	Tratamiento			
	C	LG	AQB	IP
0	$17,33 \pm 0,59$	$20,80 \pm 0,75$	$27,73 \pm 0,91$	$25,68 \pm 1,82$
1	$19,70 \pm 0,54$	$22,30 \pm 0,85$	$27,25 \pm 0,83$	$26,30 \pm 1,60$
2	$17,20 \pm 0,37$	$21,10 \pm 0,78$	$26,88 \pm 0,97$	$25,80 \pm 1,78$
3	$22,33 \pm 0,33$	$21,50 \pm 0,50$	$26,00 \pm 0,00$	$25,33 \pm 2,09$
4	$23,83 \pm 0,44$	$22,83 \pm 1,17$	$26,00 \pm 1,00$	$23,00 \pm 2,08$

Peso de los órganos (timo y bazo)

El análisis estadístico de los pesos tímicos indicó una diferencia entre sexos ($p < 0,05$), pero no entre tratamientos, aunque si se observó una tendencia en las hembras tratadas con IP ($0,08 \pm 0,010$ g) a presentar valores superiores a los controles ($0,06 \pm 0,002$ g; $p < 0,1$) (Figura 1).

Por otra parte, tras analizar los pesos esplénicos, no se observaron diferencias entre los grupos ensayados de hembras aunque si en los de machos, donde los individuos tratados con AQB e IP exhibieron valores menores respecto a control ($p < 0,05$) (Figura 1).

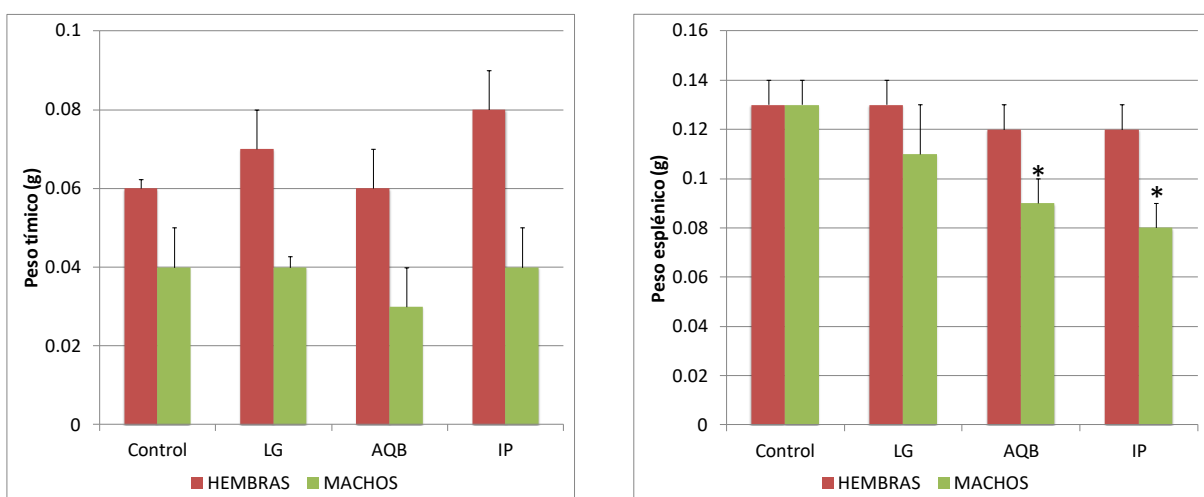


Figura 1: Peso tímico (izquierda) y esplénico (derecha) de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media (g) +/- E.E. ($n > 3$). * $P < 0,05$.

3.1.3. Contenido de compuestos fenólicos tisulares

Tras llevar a cabo los procedimientos que permitieron identificar la concentración de fenoles totales en los timos, bazos y sangre obtenidos a partir del ensayo de consumo oral de LG, AQB e IP, se observaron algunas diferencias sexo-dependiente significativas en la distribución tisular de estos compuestos.

En hembras, se constató una fenolemia disminuida, respecto a control, tras el consumo de AQB ($15,33 \pm 4,24$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,05$). Simultáneamente, tuvo lugar un incremento de los fenoles en los timos de ratones hembras tratados con IP ($0,68 \pm$

0,05 EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,05$) y AQB ($0,50 \pm 0,11$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,1$) (Figura 2).

En machos, por otro lado, los compuestos fenólicos aportados exhibieron mayor afinidad por el compartimento vascular, donde los valores evidenciaron un incremento significativo tras el aporte de AQB ($37,73 \pm 6,36$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,05$) y una tendencia a aumentar por el consumo de IP ($36,30 \pm 9,98$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,1$). Paralelamente, se observó una reducción significativa de estos compuestos en bazo, asociada al consumo de AQB ($1,44 \pm 0,03$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,05$) y una tendencia a disminuir en los grupos LG e IP ($1,00 \pm 0,32$ y $1,23 \pm 0,33$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente; $p < 0,1$). Este efecto se verificó también en timo tras el aporte de IP ($0,17 \pm 0,001$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,05$) (Figura 2).

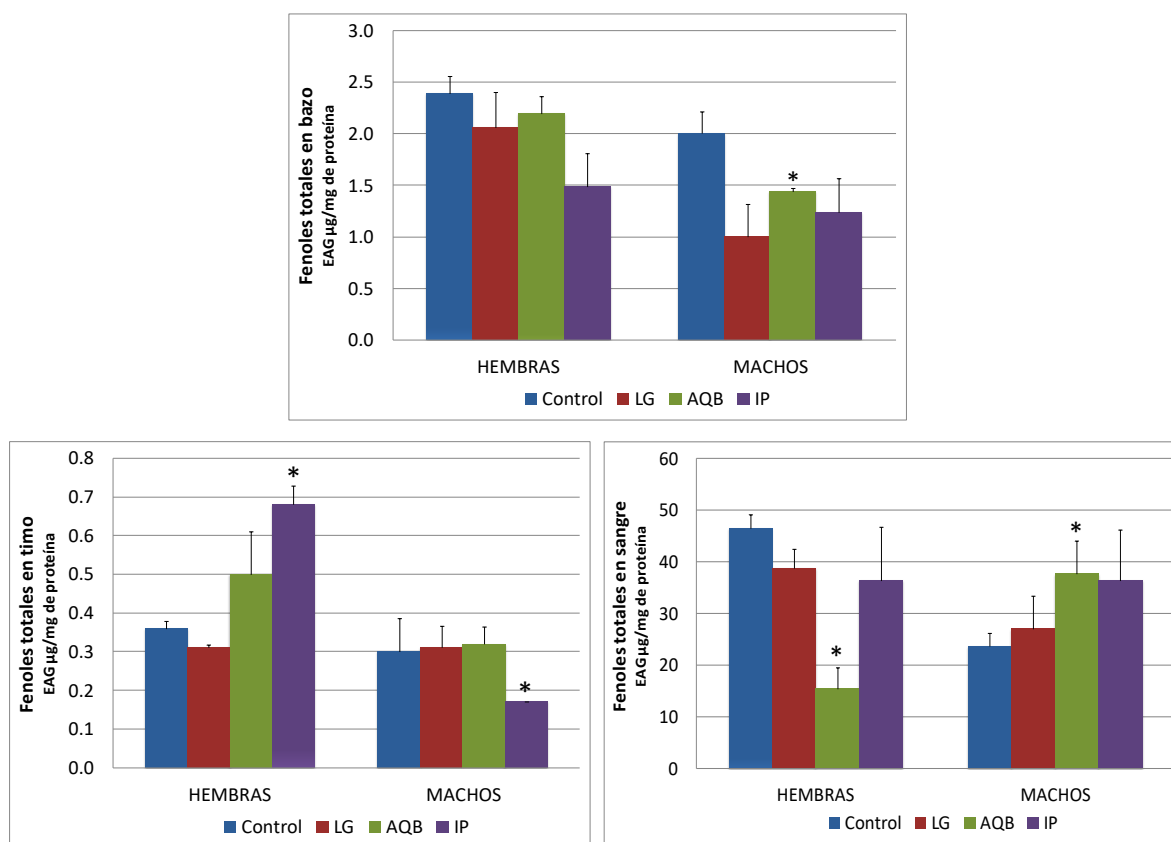


Figura 2: Concentración de fenoles totales en bazos (arriba), timos (izquierda abajo) y sangre (derecha abajo) de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media (EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) \pm E.E. ($n > 3$). * $P < 0,05$.

3.2. Efecto del consumo de fitoextractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebracho-blanco* e *Ilex paraguariensis* sobre el balance redox en timo, bazo y sangre.

3.2.1. Formación de Anión Superóxido

No se observaron diferencias significativas, respecto a control, en bazos y timos de los animales hembras y machos tratados con los distintos fitoextractos. No obstante, se observó una tendencia a incrementarse la concentración de anión superóxido en la sangre de machos tratados con LG e IP ($p < 0,1$) (Figura 3).

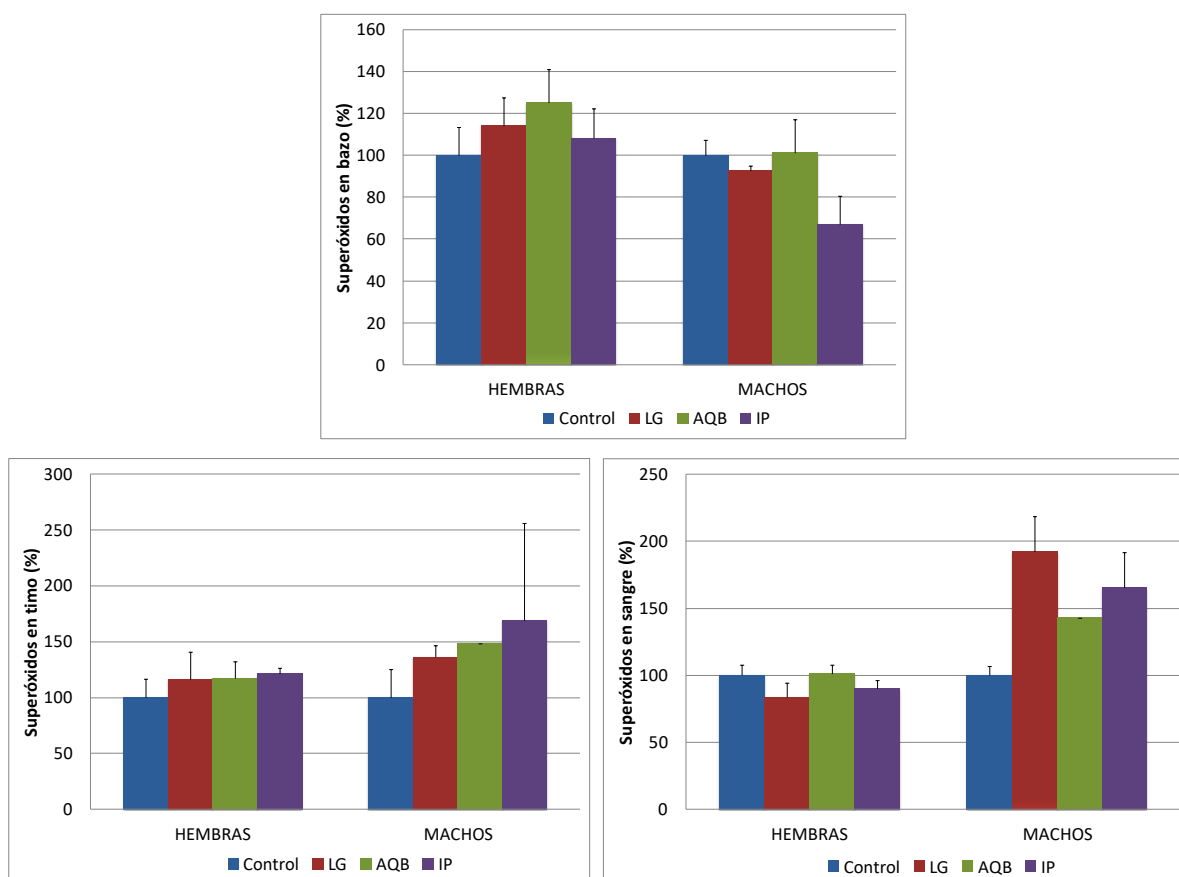


Figura 3: Formación de anión superóxido en bazos (arriba), timos (izquierda abajo) y sangre (derecha abajo) de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

3.2.2. Peróxidos acuosos y lipídicos (HP y LP)

Los porcentajes calculados en función de la colorimetría, indicaron una disminución significativa de los valores detectados de HP en bazos de las hembras tratadas con LG y AQB (42,22 y 50,00%, respectivamente; $p < 0,05$), respecto de sus controles; y una tendencia igual en machos tratados con IP (50,00%; $p < 0,1$) (Figura 4).

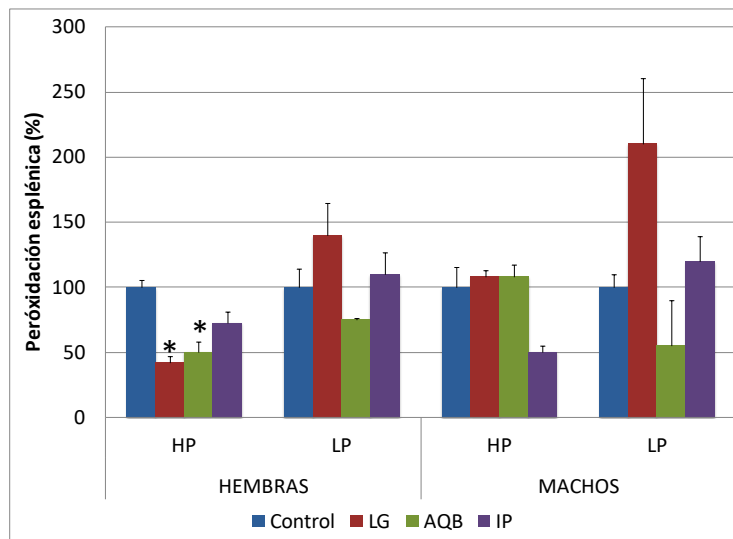


Figura 4: Formación de hidroperóxidos (HP) y lipoperóxidos (LP) en bazos de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. (n>3). * $P < 0,05$.

En timo, por su parte, se observaron algunas diferencias no significativas en hembras entre los resultados de los grupos con tratamientos y los controles, mayores aún en los individuos tratados con IP durante 30 días, en los que tuvo lugar una tendencia a aumentar los valores dosados de HP y LP (172,41 y 200,00%, respectivamente; $p < 0,1$) (Figura 5).

De manera simultánea, en el tejido sanguíneo de los animales hembras, los HP aumentaron significativamente, respecto a control, en aquellos grupos tratados con LG e IP (150,00%; $p < 0,05$); mientras que en machos, el aporte de LG tiende a reducir simultáneamente la formación de HP y LP (50,00%; $p < 0,1$); y el consumo de AQB los HP dosados en sangre (50,00%; $p < 0,1$) (Figura 6).

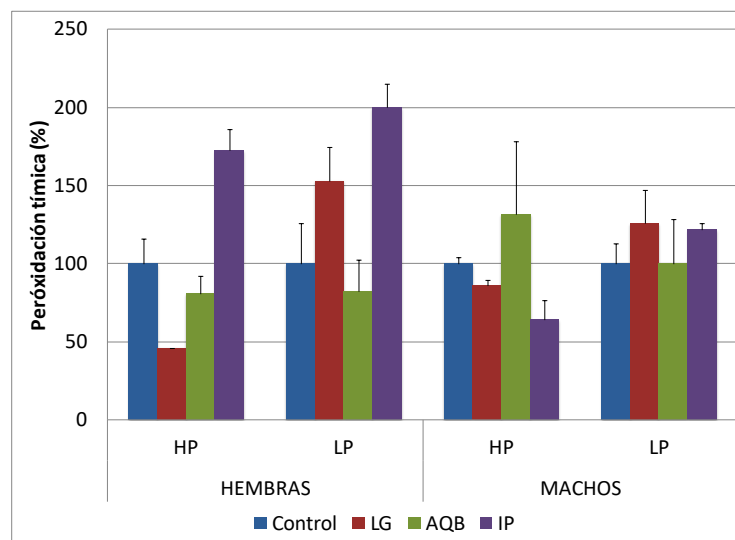


Figura 5: Formación de hidroperóxidos (HP) y lipoperóxidos (LP) en timos de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

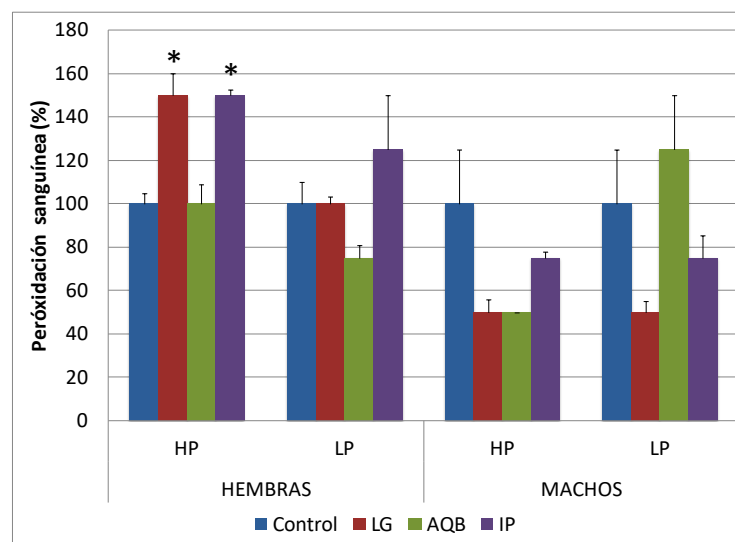


Figura 6: Formación de hidroperóxidos (HP) y lipoperóxidos (LP) en sangre de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

3.2.3. Formación de nitritos

Se determinó que, tanto en bazo como en timo, los valores obtenidos fueron semejantes a control en ambos sexos o variaron escasamente por debajo de este valor. Sólo en el caso de aquellos individuos machos tratados con AQB el timo acusó un valor significativamente mayor ($13,85 \pm 0,87 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,05$), con respecto a su control ($7,19 \pm 0,93 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Tabla 3).

En sangre, por su parte, no se pudieron determinar valores, por interferencia de la técnica.

Tabla 3: Formación de nitritos en bazo, timo y sangre de ratones Balb/c, según grupo experimental y sexo, sometidos durante 30 días a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg/día de extracto (Control), 100 mg/Kg/día de *Lantana grisebachii* (LG), 100 mg/Kg/día de *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) y 100 mg/Kg/día de *Ilex paraguariensis* (IP). Los valores son expresados como la media ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) \pm E.E. ($n > 3$). * $P < 0,05$.

	BAZO		TIMO		SANGRE	
	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO
C	$116,33 \pm 9,43$	$107,85 \pm 13,83$	$9,31 \pm 0,28$	$7,19 \pm 0,76$	N/D	N/D
LG	$97,07 \pm 15,13$	$109,63 \pm 21,04$	$7,57 \pm 0,48$	$7,19 \pm 1,07$	N/D	N/D
AQB	$96,91 \pm 15,66$	$92,03 \pm 21,27$	$10,09 \pm 1,66$	$13,85 \pm 0,62^*$	N/D	N/D
IP	$95,15 \pm 16,86$	$83,94 \pm 44,06$	$7,29 \pm 0,13$	$5,29 \pm 1,37$	N/D	N/D

3.3. Efecto xenohormético en esplenocitos de los fitoextractos seguros frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.

3.3.1. Determinación de viabilidad

Al someter a análisis los datos y compararlos con los obtenidos en el grupo control, se observó un descenso de la viabilidad celular estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en aquellos animales que recibieron la DL50 ip de arsenito de sodio (56,38%). Por su parte, el aporte oral de AQB resultó también tóxico (34,97%), aunque este efecto no fue aditivo con arsénico (57,55%).

Por otro lado, las lecturas halladas en animales tratados con 50 mg/Kg de IP mantuvieron valores similares al grupo control (91,80%) y en aquellos que recibieron además

la DL50 ip de arsenito (IP + As) el porcentaje calculado alcanzó el 72,74%, recuperando la viabilidad celular con respecto al grupo arsenico. (Figura 7).

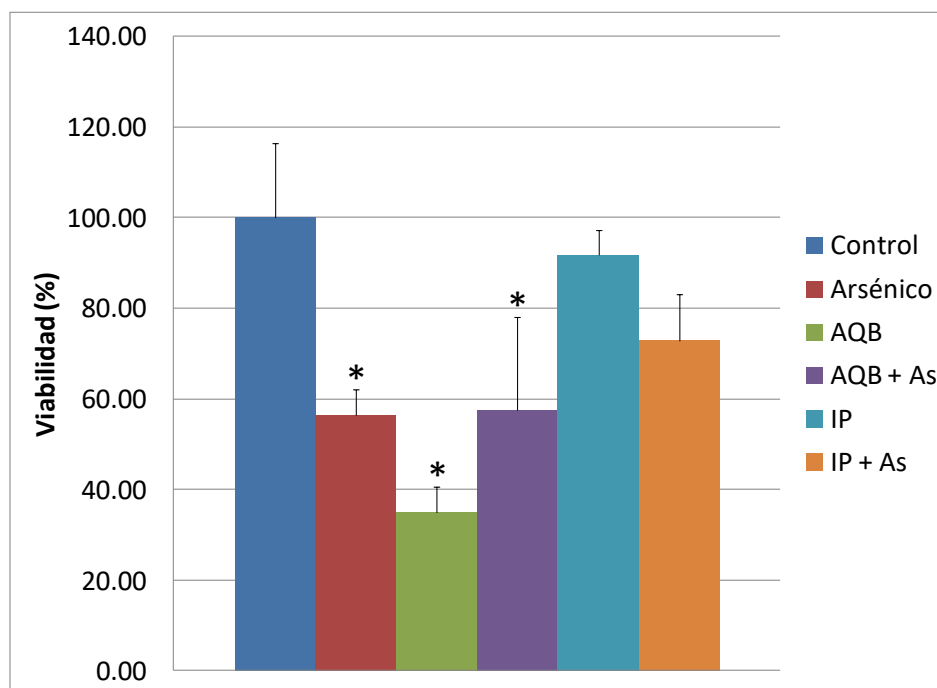


Figura 7: Viabilidad de esplenocitos obtenidos por cultivo primario de bazo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg AQB + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (AQB), 50 mg/Kg AQB + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (AQB + As), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + As). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

3.4. Cambios oxidativos en sangre, bazo y timo asociados al uso del fitoextracto seguro y bioactivo en toxicidad aguda inducida por arsénico.

3.4.1. Medición de compuestos bioactivos

Determinación de arsénico

Teniendo en consideración los límites de detección de la metodología aplicada, la presencia de arsénico fue confirmada en las muestras de bazo y riñón de animales del grupo arsenico e IP + arsenico (> 0,2 ppm p/p), y se determinó la ausencia o valores no detectables en aquellas originarias del grupo control e IP (< 0,2 ppm p/p).

Cuantificación de compuestos fenólicos tisulares

A partir de los ensayos realizados sobre los sobrenadantes ácido-metanólicos de las muestras de grupo control, arsénico, IP e IP + arsénico para identificar la concentración de fenoles totales en los bazos, timos y sangre obtenidos del modelo experimental propuesto se obtuvieron los resultados que siguen.

La concentración de fenoles totales en los bazos de los animales que recibieron la DL50 ip de arsenito de sodio ($0,33 \pm 0,07$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,1$) tiende a disminuir con respecto a control ($0,59 \pm 0,11$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), no obstante estos valores fueron recuperados e igualados a control en aquellos que recibieron previamente la monodosis oral de extracto acuoso de IP ($0,61 \pm 0,22$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e incrementados (respecto a control) en el grupo IP ($0,86 \pm 0,06$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,1$) (Figura 8).

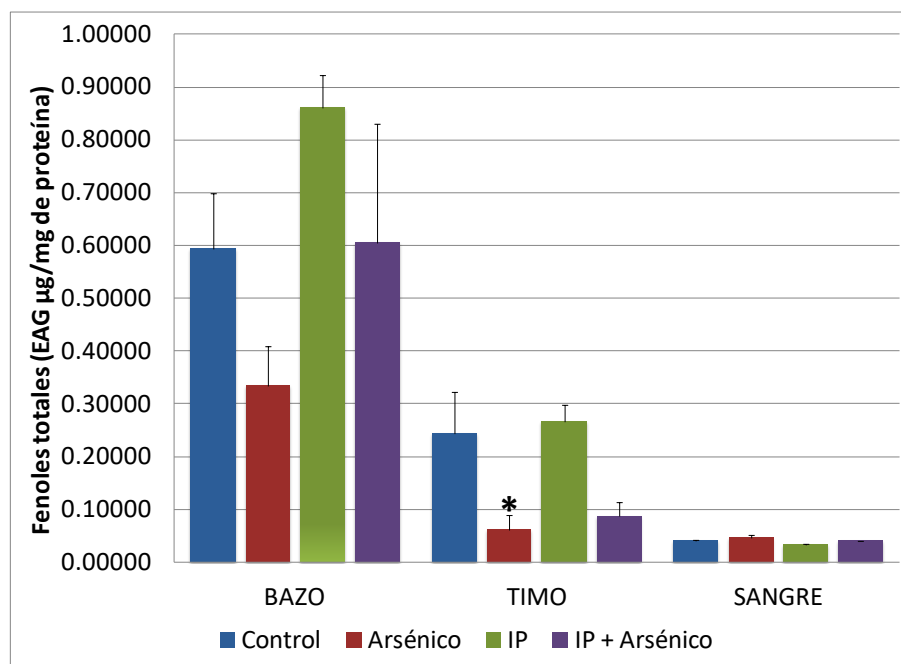


Figura 8: Concentración de fenoles totales en bazos, timos y sangre de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

En timo, por su parte, se observó un descenso ($p < 0,05$) de la concentración de compuestos fenólicos en el grupo que recibió la DL50 ip de arsenito ($0,06 \pm 0,03$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) con respecto a control ($0,24 \pm 0,08$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), efecto que se sostuvo aún con el uso concomitante de IP en dosis de 50 mg/Kg, aunque los resultados sólo representan una tendencia ($0,09 \pm 0,03$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0,1$). Simultáneamente, al analizar la sangre de los individuos tratados y control no se registraron variaciones significativas en la concentración de la variable en estudio (Figura 8).

Cuantificación de hierro

Tras medir la formación del complejo azul-violáceo en las muestras procesadas de bazo y timo se observó que, la inyección intraperitoneal de arsenito de sodio condujo a una depresión significativa, respecto a los controles ($0,150 \pm 0,030$ μg de hierro/mg de proteína), en la concentración total de hierro a nivel del bazo ($0,086 \pm 0,012$ μg de hierro/mg de proteína; $p < 0,05$) (Figura 9).

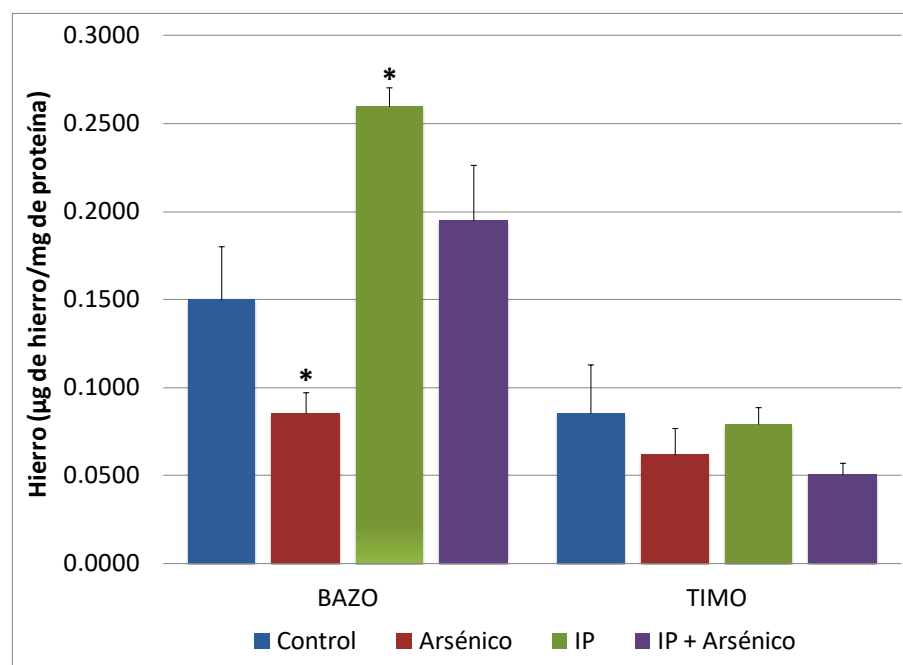


Figura 9: Concentración de hierro en bazos y timos de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO_2 (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO_2 ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (μg de hierro/mg de proteína) \pm E.E. ($n > 3$). * $P < 0,05$.

Este efecto fue revertido en el grupo IP + arsénico, donde se observó una recuperación de los valores y una leve tendencia a aumentar incluso con respecto a los animales controles ($0,195 \pm 0,032 \mu\text{g}$ de hierro/mg de proteína). Por su parte, los bazos de los animales tratados sólo con IP mostraron un incremento en la concentración de este mineral por encima de los demás grupos ($0,260 \pm 0,011 \mu\text{g}$ de hierro/mg de proteína, $p < 0,05$) (Figura 9).

No se observaron variaciones en la concentración de hierro entre los timos de los animales de los diferentes grupos experimentales.

3.4.2. Medición de marcadores oxidativos

Peróxidos acuosos y lipídicos (HP y LP)

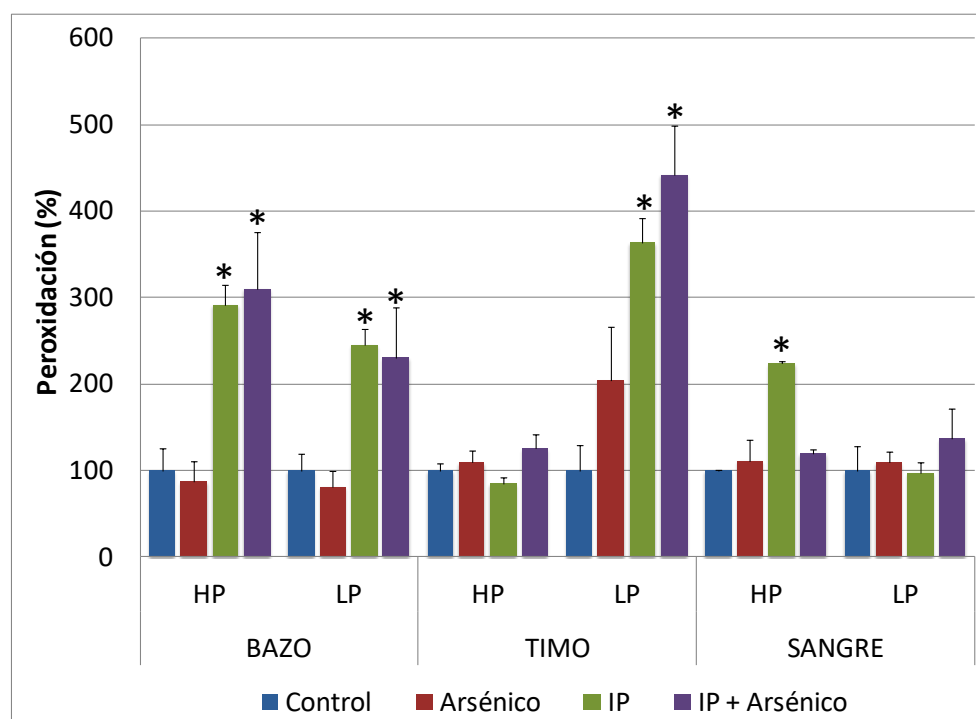


Figura 10: Formación de hidroperóxidos (HP) y lipoperóxidos (LP) en bazos, timos y sangre de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO_2 (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO_2 ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. ($n > 3$). * $P < 0,05$.

Tras llevar a cabo la metodología propuesta y el análisis de los resultados se observó, en bazo, un incremento en la formación de hidro y lipoperóxidos en los animales que fueron

tratados con 50 mg/Kg de IP, indicando valores que superaron a los de control en un 290,71% (IP) y 310,25% (IP + arsénico) para hidroperóxidos y en 245,60% (IP) y 229,67% (IP + arsénico) para lipoperóxidos ($p < 0,05$). Este efecto del tratamiento con IP sobre la formación de los peróxidos de naturaleza lipídica también se confirmó en timo, donde tuvo lugar un incremento del 363,88% en el grupo IP y del 442,40% en el grupo IP + arsénico, con respecto a control ($p < 0,05$). En tejido sanguíneo, por su parte, sólo tuvo lugar un aumento en la producción de los hidroperóxidos en el grupo IP (223,83%; $p < 0,05$) (Figura 10).

Productos avanzados de oxidación proteica (PAOP)

Tras ensayar y dosar, en las muestras de bazo y timo, la formación de productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) que tienen lugar como resultado de la oxidación de macromoléculas de naturaleza proteica, se obtuvieron los datos que se detallan a continuación.

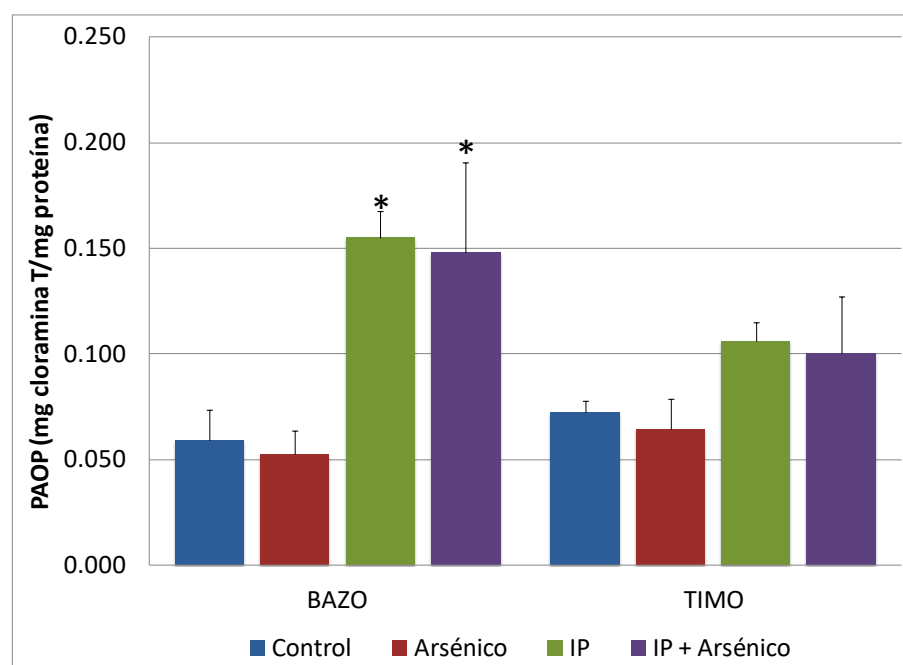


Figura 11: Formación de productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) en bazo y timo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (mg de cloramina T/mg de proteína) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

Se presentó, en bazo, un incremento de la formación de estos compuestos en los grupos experimentales IP ($0,155 \pm 0,013$ mg de cloramina T/mg de proteína; $p < 0,05$) e IP + arsénico ($0,148 \pm 0,050$ mg de cloramina T/mg de proteína; $p < 0,05$) con respecto a control ($0,059 \pm 0,018$ mg de cloramina T/mg de proteína). En timo, por su parte, se observó un efecto similar en el grupo IP ($0,106 \pm 0,009$ mg de cloramina T/mg de proteína; $p < 0,1$), ya que los valores dosados superaron a los del grupo control ($0,072 \pm 0,006$ mg de cloramina T/mg de proteína), aunque no de manera estadísticamente significativa (Figura 11).

3.4.3. Medición de grupos sulfhidrilos

Luego de llevar a cabo el protocolo desarrollado para determinar los grupos sulfhidrilos (-SH) libres en las muestras, se procedió al tratamiento y análisis de los datos obtenidos y se observó lo que sigue.

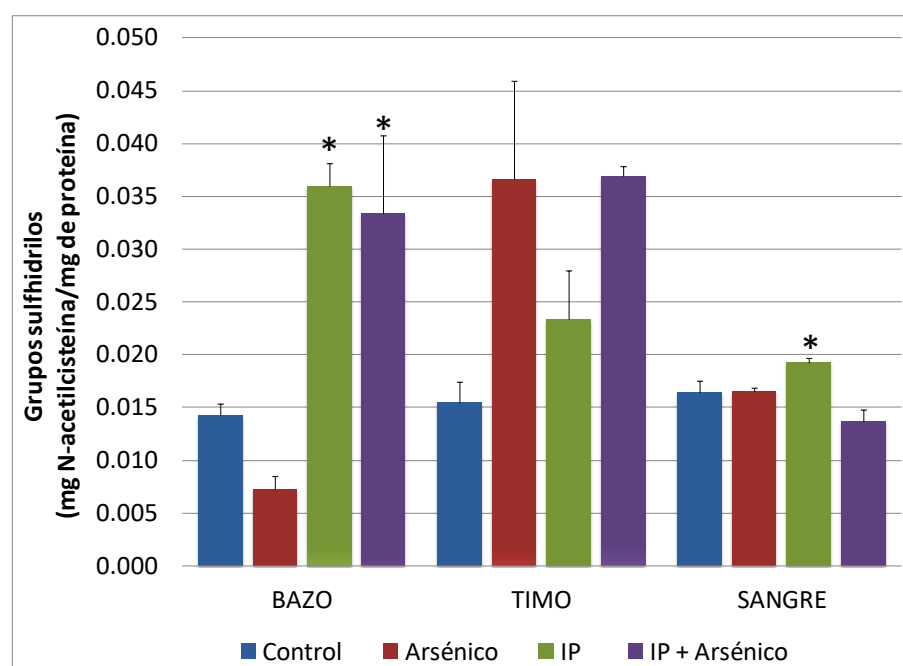


Figura 12: Concentración de grupos sulfhidrilos en bazos, timos y sangre de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

En bazo, los grupos IP e IP + arsénico presentaron valores significativamente superiores al grupo control para esta variable ($0,036 \pm 0,002$ y $0,033 \pm 0,009$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína, respectivamente; $p < 0,05$). No obstante, tras la inyección intraperitoneal de arsenito de sodio (grupo arsénico), la concentración de grupos tioles libres tiende a disminuir ($0,0072 \pm 0,0014$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) con respecto a control ($0,0142 \pm 0,0014$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína).

En timo, por su parte, se observaron sólo tendencias en las cuales se presenta un incremento en la concentración de grupos sulfhidrilos libres en las muestras obtenidas del grupo arsénico ($0,037 \pm 0,009$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) y el grupo IP + arsénico ($0,037 \pm 0,001$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) con respecto al control ($0,015 \pm 0,002$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína). Adicionalmente, en sangre sólo se observaron variaciones significativas entre los resultados dosados en el grupo IP ($0,019 \pm 0,0004$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína; $p < 0,05$) y el grupo control ($0,016 \pm 0,001$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) (Figura 12).

3.5. Vías metabólicas involucradas en la bioactividad del fitoextracto seleccionado frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.

3.5.1. Medición de glucosa

Se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos tras desarrollar el protocolo establecido y se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la concentración de glucosa en los grupos experimentales que recibieron la monodosis de extracto acuoso de IP (IP = $0,00088 \pm 0,00004$ μ g de glucosa/célula; IP + arsénico = $0,00078 \pm 0,00013$ μ g de glucosa/célula) con respecto a control ($0,000457 \pm 0,000040$ μ g de glucosa/célula). Aunque este efecto no fue observado en ensayos preliminares realizados, durante el desarrollo de la técnica, sobre el tejido esplénico completo.

Adicionalmente, los datos dosados no revelaron variaciones en la concentración de glucosa en los esplenocitos de los animales tratados con la DL50 de arsenito con respecto a control (Figura 13).

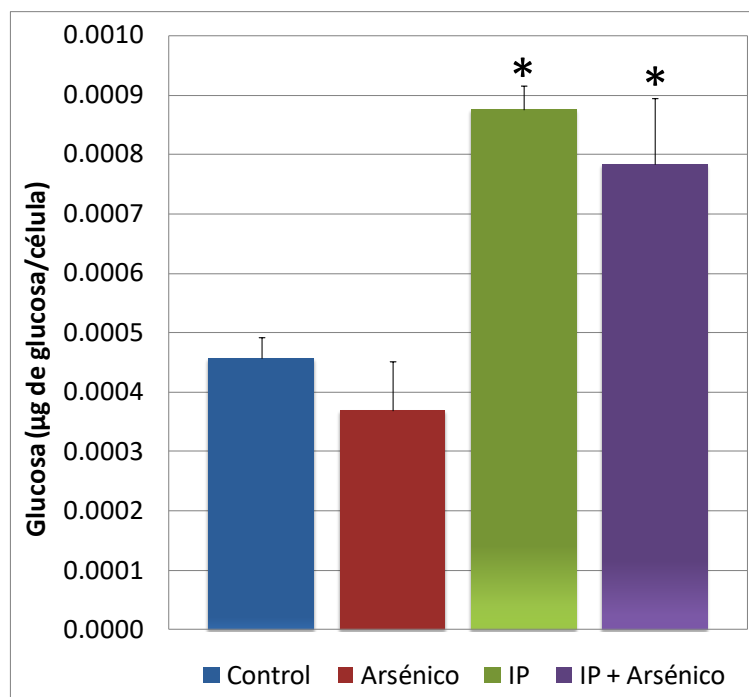


Figura 13: Concentración de glucosa en esplenocitos obtenidos por cultivo primario de bazo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (µg de glucosa/célula) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

3.5.2. Medición de lactato

El análisis de los resultados obtenidos indicaron una disminución del 63,04%, respecto al grupo control, en la concentración del lactato en los esplenocitos de los animales tratados con el extracto acuoso de IP (50 mg/Kg en monodosis oral) y la DL50 intraperitoneal de arsenito (p<0,05). En tanto, los grupos arsénico e IP mostraron una disminución del 34,34% y el 30,00% respectivamente (p<0,1) (Figura 14).

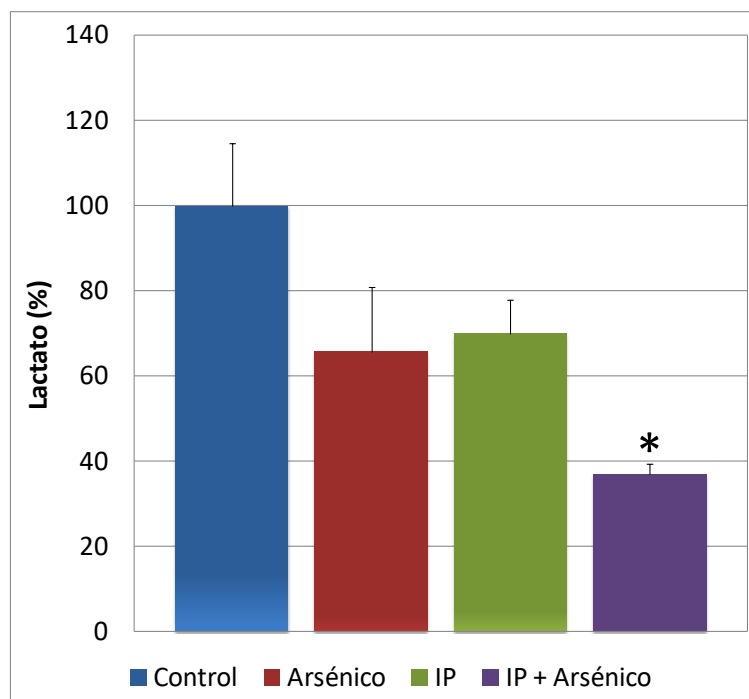


Figura 14: Concentración de lactato en esplenocitos obtenidos por cultivo primario de bazo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (% de área respecto a control) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

3.5.3. Medición de anión superóxido (SO)

Al medir la formación y acumulación de anión superóxido se observó una concentración mayor de este compuesto en los esplenocitos provenientes de los grupos experimentales IP e IP + arsénico, arrojando valores que superan a los de control en un 145,56% y 153,42% respectivamente, aunque estas variaciones no llegan a ser significativas estadísticamente ($p < 0,1$) (Figura 15).

El grupo arsénico, por su parte, no presentó variaciones en los datos respecto a control.

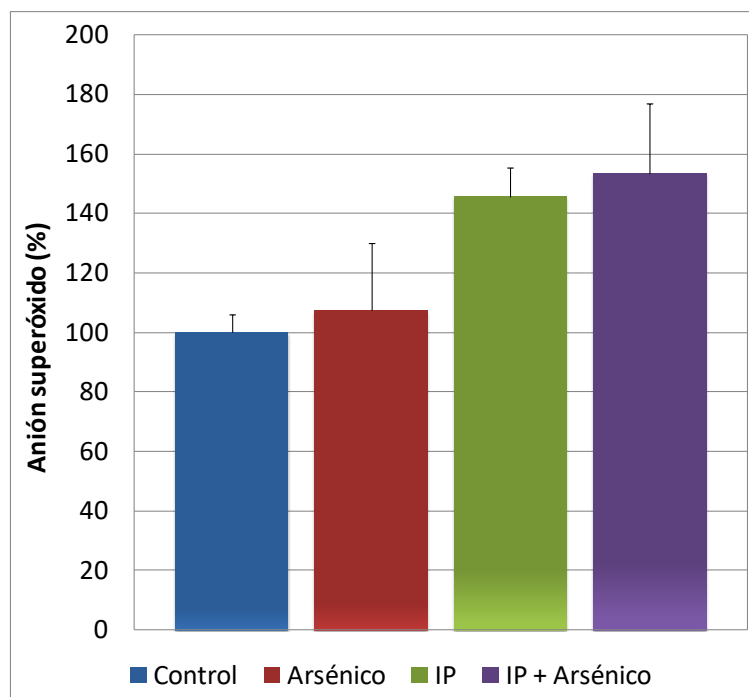


Figura 15: Formación de anión superóxido en esplenocitos obtenidos por cultivo primario de bazo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (% de área respecto a control) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

3.5.4. Medición de grupos sulfhidrilos

Al medir los grupos sulfhidrilos libres en los esplenocitos murinos se observó una tendencia a disminuir la concentración de estos compuestos en el grupo que recibió la DL50 ip de arsenito ($0,000015 \pm 0,000002$ μg de N-acetilcisteína/célula; $p < 0,1$) al comparar los valores obtenidos con el grupo control ($0,000030 \pm 0,000006$ μg de N-acetilcisteína/célula). No obstante, en los grupos que recibieron la dosis de IP, de manera previa a la inyección intraperitoneal de arsenito o solución fisiológica, se observó el efecto inverso ($p < 0,05$) ya que los dosajes de grupos sulfhidrilos se incrementaron incluso por encima de los valores obtenidos en el grupo control (IP = $0,000064 \pm 0,000003$ μg de N-acetilcisteína/célula; e IP + arsénico = $0,000049 \pm 0,000010$ μg de N-acetilcisteína/célula) (Figura 16).

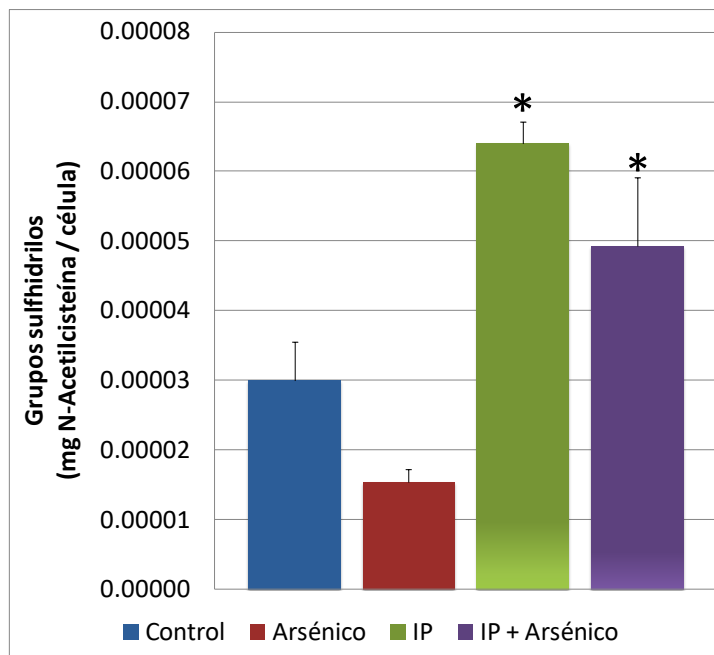


Figura 16: Concentración de grupos sulfhidrilos en esplenocitos obtenidos por cultivo primario de bazo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de extracto + 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 0 mg/Kg de extracto + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico), 50 mg/Kg IP + 0 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP) y 50 mg/Kg IP + 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (IP + Arsénico). Los valores son expresados como la media (µg de N-acetilcisteína/célula) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

3.5.5. Medición de NF-κB activo

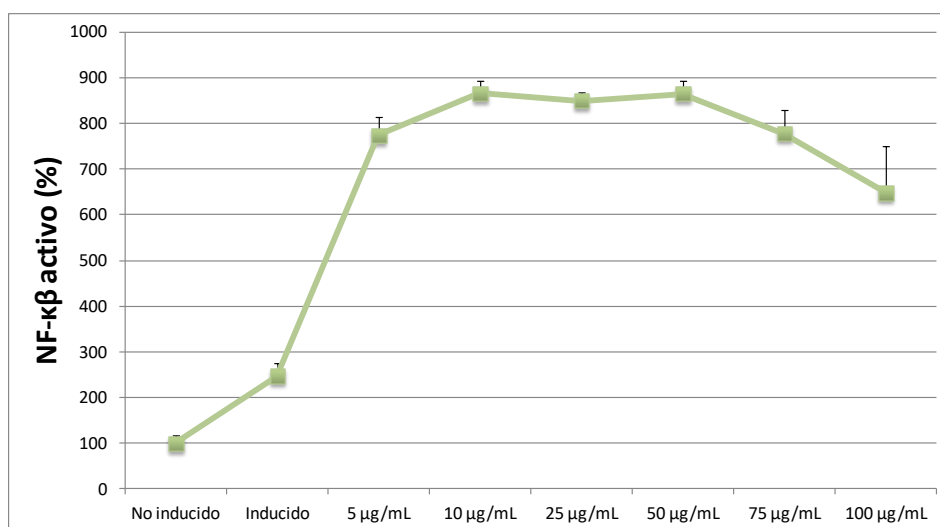


Figura 17: Concentración de NF-κB activo en células transfectadas tratadas con *Ilex paraguariensis*. Los valores son expresados como la media (% respecto a células no inducidas) +/- E.E.

Tras determinar la activación del NF- κ B por luminiscencia se analizaron los resultados obtenidos verificándose que IP incrementa la actividad de este factor nuclear (Figura 17).

3.5.6. Determinación del potencial mitocondrial

Se observó un incremento, respecto al grupo control, de la variable medida en los animales tratados con AC de forma oral (AC: 150,00%; $p < 0,05$) (Figura 18).

Adicionalmente, el análisis de los datos disponibles determinó un efecto, dosis dependiente, inverso o negativo de arsénico ($p = 0,0632$) y directo o positivo de AC ($p = 0,0034$) sobre el potencial de membrana mitocondrial (regresión lineal).

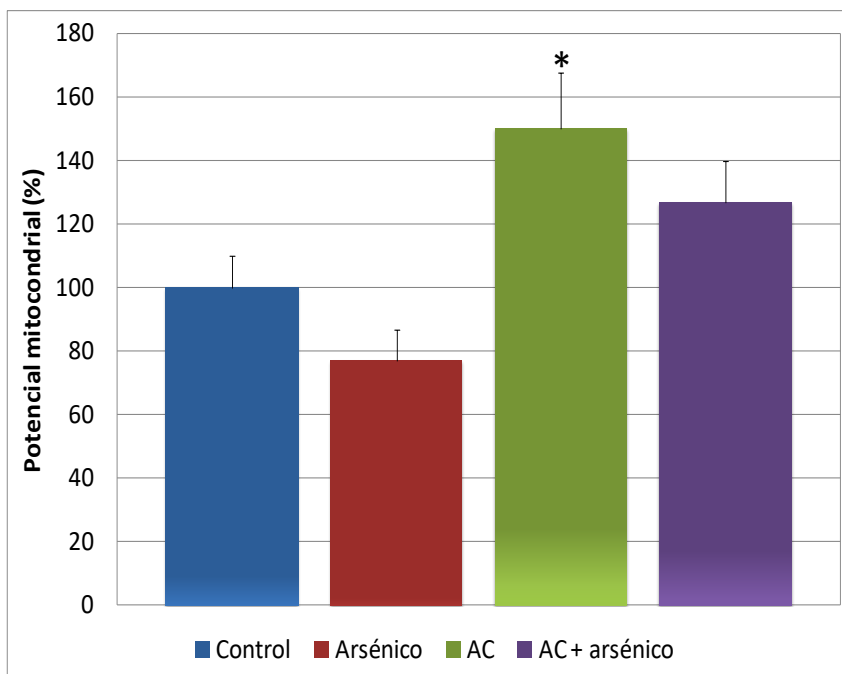


Figura 18: Medición del potencial de membrana mitocondrial en esplenocitos obtenidos por cultivo primario de bazo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de ácido clorogénico + 0 mg/Kg de NaAsO_2 (Control), 0 mg/Kg de ácido clorogénico + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip (Arsénico) 20 mg/Kg de ácido clorogénico + 0 mg/Kg de NaAsO_2 (AC) y 20 mg/Kg de ácido clorogénico + 19 mg/Kg de NaAsO_2 ip (AC + arsénico). Los valores son expresados como la media (% de área respecto a control) \pm E.E. ($n > 3$). * $P < 0,05$.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Los compuestos derivados de arsénico constituyen un gran número de agentes químicos con una elevada toxicidad para el ser humano. Sus fuentes de procedencia son diversas y pueden ingresar al organismo a través de la vía respiratoria, dérmica y, en mayor medida, oral a través del agua de bebida y los alimentos o la ingesta accidental (Grinyó et al., 2012, Ferrario et al., 2016).

Existen diversos estudios que plantean los mecanismos de toxicidad del arsénico en sus distintos estados de oxidación, frente a los cuales los órganos y tejidos hemolinfáticos se posicionan como blancos de sus efectos deletéreos (Cordero et al., 2018). De esta manera, los compuestos arsenicales se constituyen como poderosos inmunotóxicos responsables probados de la adquisición de enfermedades infecciosas y el desarrollo de tumores y otras patologías de base crónica (Acharya et al., 2010) por promoción de inmunodeficiencia secundaria con compromiso de las defensas del organismo (Chinen y Shearer, 2010; Savino y Dardenne, 2010).

En la actualidad se conoce que alrededor de 60 a 100 millones de personas en todo el mundo se encuentran expuestas a este contaminante y vulnerables a sus efectos tóxicos (Ng, 2005; IARC 2014), por lo que se constituye como un serio problema de atención pública en numerosos países que requiere de investigaciones en el área que aporten datos significativos para avanzar en el abordaje y solución de la problemática.

En tal sentido, un creciente número de fitoquímicos identificados en el mundo vegetal han mostrado propiedades promisorias como agentes inmunomoduladores (Tiwari et al., 2018), aunque sus mecanismos de acción deben ser exhaustivamente estudiados para poder establecer recomendaciones a partir de éstos. Por ello, para la presente tesis doctoral se planteó el estudio de productos derivados de infusiones de *Lantana grisebachii* (LG), *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) e *Ilex paraguariensis* (IP), tales como los extractos y los compuestos en ellos contenidos, como posibles inmunoestimulantes capaces de incrementar la resistencia de órganos, tejidos y células del sistema inmunológico frente a tóxicos ambientales como el arsénico.

4.1. Contenido fenólico en extractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebrachoblanco* e *Ilex paraguariensis* y su biodisponibilidad por ingesta en timo, bazo y sangre.

La respuesta de los tejidos y células inmunes a la regulación por fitoextractos implica preservar la homeostasis redox (Suzuki et al., 2010), la cual puede ser condicionada por la biodisponibilidad hemolinfática de los fitoquímicos con actividad biológica que éstos proveen (Kawai, 2011), entre los cuales se encuentran los compuestos fenólicos. En este sentido, se procedió a determinar y cuantificar su presencia en extractos acuosos de LG, AQB e IP.

Los resultados obtenidos confirmaron a los tres extractos vegetales como fuentes de compuestos fenólicos (IP, LG y AQB en orden decreciente). Esto es coherente con los resultados publicados por Cittadini y colaboradores, quienes identificaron, por HPLC-DAD-MS, 21 compuestos de naturaleza fenólica en LG, 31 en AQB y 23 en IP, los cuales corresponden, en su mayoría, a: iridoides, tales como dihidrotevesida y tevesida, en LG; derivados del ácido hidroxibenzoico en AQB y derivados del ácido quínico en IP (Cittadini et al., 2018).

De manera preliminar, se confirmó que los fitoextractos estudiados no comprometían la alimentación y la hidratación de los animales en experimento, por lo que el crecimiento ponderal de los mismos no se vio afectado. Se procedió así a su ensayo *in vivo*, bajo las condiciones definidas en el apartado 2.2.1.3 de la presente tesis, con el objeto de determinar la biodisponibilidad hemolinfática de los fenoles dosados en el extracto y, tras evaluar la concentración fenólica en bazo, timo y sangre, se observó que las hembras presentaron valores en general superiores para esta variable. En este sentido, Albrecht y colaboradores advierten en sus estudios una acumulación superior de compuestos fenólicos en hígados de hembras, tras la ingesta oral de LG, AQB e IP (Albrecht et al., 2017), en concordancia con la conocida capacidad metabólica elevada de los machos (Wu B et al., 2011). Esto se corresponde con los hallazgos obtenidos en la presente tesis, ya que el hígado, por ser un órgano metabólico donde los compuestos fenólicos arriban luego de la absorción, condiciona la biodisponibilidad posterior en sangre y el resto de los tejidos (Clifford et al., 2013).

Adicionalmente, los valores absolutos hallados en sangre fueron superiores a las concentraciones determinadas en bazo y timo, aunque se observó una diferencia en la

cinética tisular entre sexos. Esta mayor afinidad por el compartimento vascular puede depender de diferencias entre transportadores en sangre *versus* transportadores periféricos, las cuales a su vez difieren según el sexo del animal (Lu et al., 2007) y el estado redox del organismo, ya que las proteínas oxidadas sufren un debilitamiento en la capacidad de unión que deriva en el cambio de afinidad por los transportadores y en la cinética de los compuestos involucrados (Oettl y Stauber, 2007). Por consiguiente, los compuestos fenólicos se incrementaron en la sangre de machos mediante el tratamiento con AQB, pero se redujeron en el bazo, lo cual podría estar relacionado con una reducción eritrocitaria con menor afinidad linfática (efectos implicados en la pérdida de peso esplénico). En cambio, la fisiología de la sangre femenina involucraría interacciones fenol - transportadores débiles (Xiao y Kai, 2012), lo que conduce a una baja fenolemia y un incremento concomitante de fenoles en timo. Por otra parte, esta diferencia sexo-dependiente en la distribución tisular de los compuestos fenólicos respondió al tratamiento IP de una manera similar, con una elevación significativa en timos de hembras después de la ingesta del fitoextracto.

En relación con posibles efectos tróficos de los extractos, la disminución de peso de los órganos linfáticos en machos, timo principalmente, puede asociarse con los efectos de sus compuestos con actividad de tipo hormonal y antiinflamatoria, que reducirían el tejido linfático, de forma potenciada por las características endocrinas de los machos (Jia et al., 2012). En este sentido, las acciones de AQB e IP son consecuentes con lo reportado por la bibliografía y su uso en enfermedades inflamatorias, tales como asma, fiebre y heridas cutáneas (Goleniowski et al., 2006). Más aún, sus flavonoides y alcaloides antioxidantes (por ejemplo, aspidospermina, quebrachamina, razinilam, etc.) explicarían este efecto de AQB (Deutsch et al., 1994; Al-Hanbali et al., 2009). Mientras tanto, IP posee xantinas y polifenoles, que también reducen los linfocitos *in vitro* y exhiben propiedades antiinflamatorias (Wnuk et al., 2009; Arçari et al., 2011; Bracesco et al., 2011).

4.2. Determinación del efecto del consumo de fitoextractos de *Lantana grisebachii*, *Aspidosperma quebracho-blanco* e *Ilex paraguariensis* sobre el balance redox en timo, bazo y sangre.

Con el objeto de seleccionar los extractos vegetales de uso seguro en tratamientos *in vivo* se determinó la formación de anión superóxido (SO), hidro- y lipoperóxidos (HP y LP respectivamente) y nitritos como parámetros de estrés oxidativo para evaluar el efecto de su consumo en los tejidos hemolinfáticos de los animales ensayados.

En primer lugar, el tratamiento en machos con LG redujo los HP y LP en sangre, pero indujo en el mismo tejido la formación de SO. En bazo, mientras tanto, este extracto aumentó la producción de LP, vía que resulta de mayor toxicidad que la de los HP (Soria et al., 2008). Este efecto prooxidante sobre el tejido esplénico con incremento en la formación de peróxidos fue también observado previamente por Ramos Elizagaray y colaboradores en ratas (Ramos Elizagaray et al., en prensa). Por otra parte, en hembras, la respuesta redox disímil observada en los órganos linfáticos (con disminución de los HP e incremento de los LP), se asocia a una cinética distinta en la formación de estos marcadores (Soria et al., 2008). La elevada hidropoxidación inducida por LG en sangre podría estar asociada con un metabolismo menor sexo-dependiente de algunos de sus compuestos deletéreos, tales como los lantadenos (Wu B et al., 2011; Ramos Elizagaray y Soria, 2014).

En cuanto al tratamiento con AQB, éste fue asociado con una disminución importante en la formación de HP en sangre y bazos de ambos sexos, sin perturbar la homeostasis redox del timo. Estos efectos antioxidantes pueden estar mediados por diferentes compuestos bioactivos presentes en el extracto (Deutsch et al., 1994), pero no parecen ser fenol-dependientes. Por otra parte, la síntesis de óxido nítrico (NO) es un mecanismo inmunológico, siendo los nitritos los marcadores indirectos de su actividad (Farias-Eisner et al., 1994), lo cual fue apoyado por este trabajo, ya que éstos se encontraron más elevados en el bazo (órgano secundario con células activas) que en el timo (órgano primario con células en maduración) (Janeway et al., 2001). Sin embargo, la vía relacionada con el NO también juega un papel importante en el trofismo tímico (Mocchegiani et al., 2013), siendo mejorada con el tratamiento por AQB. De hecho, las hembras con nitritos basales superiores habían

aumentado los pesos del timo respecto a los machos. Esta regulación nitrosativa positiva observada en el grupo AQB podría responder a compuestos bioactivos de *Aspidosperma* (Campos et al., 2006). Incluso, estas moléculas podrían ser moduladores duales, como antiinflamatorio y promotores de la inmunidad celular (Kang et al., 2003).

El sexo también influyó en la respuesta redox a la ingesta de IP, con machos que presentaron ciertos efectos antioxidantes en los tejidos estudiados, mientras que sangre y timo de hembras fueron oxidados. En el caso de este último órgano, las diferencias exhibidas podrían estar relacionadas con diferencias en la cinética, previamente descritas, de los compuestos fenólicos, los cuales resultaron oxidantes. Más aún, los fenoles se relacionaron directamente con un aumento de la oxidación en la totalidad del modelo animal empleado, en concordancia con la capacidad ambivalente de los antioxidantes de actuar como dadores o receptores de electrones según el potencial redox del medio químico donde se encuentren y la susceptibilidad de los ratones a la sobreexposición de compuestos fenólicos (Murakami, 2014). Por otro lado, los efectos antioxidantes de IP se evidenciaron en la disminución de los HP en sangre de machos, lo cual indica que el extracto contendría una mezcla pleiotrópica de compuestos funcionales (Bracesco et al., 2011), frente a la cual las hembras se vieron claramente afectadas. Esta mayor susceptibilidad ha sido previamente observada en mesencéfalo y cerebelo de ratones hembras, donde la ingesta de IP incrementa la formación de LP (Miranda et al., 2017).

4.3. Efecto xenohormético en esplenocitos de los fitoextractos seguros frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.

El análisis y discusión de los datos obtenidos en respuesta a los objetivos previos permitieron identificar a AQB e IP como los extractos de interés para avanzar con su estudio. A partir de ello, se procedió al desarrollo de un modelo animal experimental que permitiera determinar el efecto del arsenito de sodio, administrado por vía intraperitoneal, sobre la viabilidad de los esplenocitos, y determinar la capacidad protectora de estos extractos acuosos siendo previamente administrados por vía oral.

En este proceso se definió, en primera instancia, la dosis de arsenito de sodio a emplear. Así se verificó, en machos, un descenso de la viabilidad de los esplenocitos dependiente de la concentración de arsénico, confirmándose éstos como células dianas del efecto deletéreo, por muerte celular, de los compuestos arsenicales (Patra et al., 2013; Soria et al., 2014). Además, la diferente respuesta a arsenito hallada entre machos y hembras es consecuente con lo descrito por otros autores (Ferrario et al., 2016).

Posteriormente, se ensayó la dosis de extracto a administrarse y el momento de ingesta adecuado que permitiera la biodisponibilidad de los fitoquímicos en ellos contenidos. Para ello, se probaron dos dosis de extracto (más control) en dos momentos de administración (previos a la inyección intraperitoneal de arsenito de sodio). La pérdida de viabilidad celular observada con el uso de 100 mg/Kg de ambos extractos apoyó empíricamente la premisa que refiere como tóxico al aporte exógeno excesivo, de ciertos compuestos considerados beneficiosos (Lambert et al., 2007). Por otro lado, en relación con la administración, se confirmó una respuesta tiempo-dependiente, confirmando que los compuestos bioactivos de los extractos son biodisponibles y activos tras 3 horas luego de ser administrados por vía oral, en consonancia con la literatura científica (Farah et al., 2008; Li G et al., 2012).

Tras quedar definidas las condiciones del modelo experimental *in vivo*, se procedió a su aplicación y determinación de la viabilidad celular en los esplenocitos obtenidos por cultivo primario de los bazo extraídos de los diferentes grupos experimentales (control, arsénico, AQB, AQB + arsénico, IP e IP + arsénico). El análisis de los resultados mostró un efecto deletéreo del AQB *per se* sobre este parámetro, y una incapacidad de proteger a las células de la toxicidad del arsenito de sodio. Esto puede deberse a compuestos inmunotóxicos presentes en este fitoextracto, tales como los alcaloides y ciertos compuestos fenólicos (Novák et al., 2004; Layne et al., 2015; Cittadini et al., 2018). Más aún, este efecto coincide con el menor peso tímico y esplénico hallado en los machos tratados con AQB en el modelo animal previo.

Por su parte, el tratamiento con IP no afectó la viabilidad de los esplenocitos, manteniendo los valores presentados por el grupo control. No obstante, su ingesta se

contrapuso al efecto deletéreo del arsénico en dichas células del bazo, incrementando su viabilidad. Estos resultados son respaldados por diferentes reportes referidos a la capacidad protectora de IP y sus compuestos frente a distintos tóxicos ambientales (Sinha et al., 2007; Ramos Elizagaray y Soria, 2014; Scotta et al., 2017).

4.4. Cambios oxidativos en sangre, bazo y timo asociados al uso del fitoextracto seguro y bioactivo en toxicidad aguda inducida por arsénico.

Arsénico, hierro y fenoles totales fueron medidos en las muestras orgánicas obtenidas de los animales experimentales, con el objeto de establecer su concentración y sus roles. Así, se confirmó la existencia de arsénico en muestras de bazo y riñón derivados de los animales sometidos al tratamiento con arsenito de sodio y su ausencia en los mismos tejidos provenientes del grupo control, lo cual confirma a éstos como bioacumuladores de compuestos arsenicales (Kenyon et al., 2008, Rubatto Birri et al., 2010; Soria et al., 2017).

Por otra parte, al analizar la concentración de fenoles en timo, bazo y sangre obtenidos de los grupos control, arsénico, IP e IP + arsénico se observó, en los dos primeros tejidos, una disminución de la biodisponibilidad de estos compuestos en las muestras tratadas con arsénico. Este hallazgo da cuenta de un posible agotamiento de los fenoles disponibles en el grupo control (provenientes de la dieta) mediado por el aporte de arsenito de sodio al organismo (D'Archivio et al., 2010). De manera simultánea, las concentraciones de estos compuestos fueron recuperadas (timo) o incrementadas (bazo) con respecto a control tras el aporte de IP, efecto que amortigua la depleción de la concentración de fenoles totales en el uso concomitante de IP + arsénico. De esta manera se constata que los fenoles contenidos en el extracto ensayado e incorporados por vía oral en una dosis única, se concentran en los tejidos dosados, aportando a la concentración total de los mismos (Terao y Mukai, 2014). Esto, como ya ha sido discutido, no se observó con el consumo de la dosis diaria establecida en el modelo animal de 30 días, donde los metabolitos fenólicos no se bioacumularon en timo y bazo de machos.

Resultados análogos a los detallados en bazo fueron encontrados, en el mismo tejido, cuando se procedió a la cuantificación de hierro. Así pudo verse una caída en los niveles de

este mineral con la administración de arsénico y un incremento por encima de los valores de control tras el aporte oral de IP. En este sentido, el mineral dosado puede tener un origen endógeno, ya que el bazo se constituye como un reservorio de eritrocitos y filtro sanguíneo (Steiniger, 2015; Brendolan et al., 2007), o exógeno, por ser el extracto de IP fuente de este metal (Wrobel et al., 2000; Carducci et al., 2000); por lo que el movimiento observado en las reservas de hierro puede corresponderse, en el primer caso, con un desplazamiento del mismo hacia la corriente sanguínea o el espacio intersticial movilizado por la capacidad de lisis del arsénico (Mahmud et al., 2009) o con una mayor biodisponibilidad sistémica por el aporte exógeno que representa IP (Wrobel et al., 2000; Carducci et al., 2000). En este sentido, otros autores han reportado previamente el efecto directo que tiene la bioacumulación de arsénico sobre el contenido y distribución de hierro en los tejidos hemolinfáticos e, indirectamente, sobre la homeostasis de otros metales tales como cobre, zinc y manganeso (Wang et al., 2006; Cui y Okayasu, 2008; Soria et al., 2017), lo cual compromete las respuestas enzimáticas de las células y contribuye a la inmunodeficiencia inducida por arsénico.

Adicionalmente, para la concreción del objetivo propuesto, se midió la formación de peróxidos (HP y LP) y productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) dosando su concentración en los tejidos hemolinfáticos. Así se detectó un incremento en la producción de HP en bazo y sangre y LP en bazo y timo de animales tratados con extracto acuoso de IP, efecto trasladable en el grupo IP + arsénico, aunque la dosis de arsenito de sodio *per se* no resulta en un aumento de las ERO como se esperaba. Estos hallazgos contrastan con la amplia bibliografía disponible que propone la generación de radicales libres como mecanismo de toxicidad inherente a la exposición a arsénico (Bongiovanni et al., 2007; Sharma et al., 2014; Ramos Elizagaray et al., en prensa) y, por otro lado, el uso de extractos de IP y sus derivados como antioxidantes naturales (Rodríguez Vaquero et al., 2010; Rivelli et al., 2011). En este sentido, frente a la dosis aguda empleada, se constata que la inducción de estrés oxidativo no sería la vía involucrada en la disminución de la viabilidad de los esplenocitos y, en una primera aproximación, los resultados recabados dan cuenta de una muerte celular temprana, sin variación en los parámetros redox dosados (Ratnaike, 2003;

Montelescaut et al., 2014). Adicionalmente, los resultados descritos permiten deducir que el contenido fenólico aportado por IP, el cual resulta en un incremento de la concentración total de estos fitoquímicos en timo y bazo, se traduce en un estado oxidado de los tejidos, resultando prooxidante en las dosis detectadas y el medio ensayado (Lambert et al., 2007; Murakami, 2014), de manera análoga al modelo animal previo de acuerdo a lo ya descrito en 4.2. Más aún, en bazo, los niveles detectados de peróxidos se reflejan en un dosaje superior de los PAOP en los grupos IP e IP + arsénico, por el incremento del daño de los radicales libres sobre las proteínas celulares (Matteucci et al., 2001; Rugale et al., 2007).

Otro mecanismo de citotoxicidad descrito para el arsénico parte de la afinidad de los arsenicales trivalentes por los grupos tioles de proteínas y péptidos como el glutatión celular (GSH) y diversas enzimas y cofactores (Meng et al., 2010; Rana et al., 2012). Por ello, se determinó la concentración de grupos sulfhidrilos libres en las muestras de timo, bazo y sangre de cada grupo experimental, observándose, en bazos del grupo arsénico, una reducción en los niveles de la variable dosada en concordancia con la reactividad de sus derivados trivalentes previamente detallada (Watanabe y Hirano, 2013). No obstante, este efecto no se observó en timo, donde la concentración de grupos sulfhidrilos se ve incrementada con la administración de arsénico, probablemente como resultado de una diferenciación en el proceso de biotransformación que tienen lugar en ambos tejidos, a partir del cual se concentra el ácido metilarsónico (MMA) en timo de acuerdo a lo observado por Xu y colaboradores (Xu et al., 2017), quienes describen la capacidad elevada de este metabolito para inducir genotoxicidad y apoptosis en este tejido (Xu et al., 2016), aunque posee diferencias con el arsénico trivalente en la selectividad de interacción con los grupos tioles (Zhou et al., 2014).

Por otra parte, el tratamiento de los animales con IP se traduce, en bazo, en un recupero de la concentración de SH perdida por arsénico, y en un incremento marcado de los valores de control que se mantienen en el grupo IP + arsénico, lo cual puede tener su origen en un aumento en la síntesis *de novo* de GSH en las células (Denzoin Vulcano et al., 2013) y en los niveles de metabolitos precursores como la S-adenosilmetionina y la cisteína por

degradación autofagocítica de las proteínas oxidadas en respuesta al estado prooxidante resultante por el tratamiento con IP (Yorimitsu et al., 2006; Ogata et al., 2006).

4.5. Vías metabólicas involucradas en la bioactividad del fitoextracto seleccionado frente a toxicidad aguda inducida por arsénico.

A fin de indagar sobre las vías involucradas en los procesos de muerte/viabilidad celular que tienen lugar tras el aporte de arsénico y el tratamiento con IP propuesto, se procedió a ensayar, en primera instancia, la concentración de glucosa en las suspensiones celulares obtenidas, como principal sustrato de energía celular. Así se observó un aumento en los niveles dosados en los esplenocitos extraídos de los tratamientos con IP (IP e IP + arsénico), efecto que no se observa al medir glucosa, en iguales condiciones, sobre el tejido esplénico en su totalidad, indicando que este compuesto ha pasado del compartimento intersticial o vascular al celular. Este evento se corresponde con lo descrito en investigaciones previas donde diversos autores plantean el uso de IP en el tratamiento de la diabetes por su capacidad de aumentar la captación de glucosa a nivel celular (Hussein et al., 2011; Klein et al., 2011; Ríos et al., 2015).

Posteriormente se cuantificó el nivel de ácido láctico celular, tras lo cual se observó una disminución en la producción de lactato en los tratamientos arsénico e IP, efecto que debe evaluarse considerando la diferencia numérica de células viables y, en consecuencia, metabólicamente activas, concluyendo que la reducción hallada corresponde con la pérdida de viabilidad en el primer caso (arsénico) (Skulachev, 2006) y con una reducción de la vía anaeróbica en el segundo (IP) (Blanco y Blanco, 2011). En este sentido, las bajas lecturas de esta variable observadas con el uso concomitante de IP y arsénico podrían ser la consecuencia de la conjunción de ambos tratamientos.

A partir de estos resultados se decide evaluar la producción de anión superóxido (SO) como indicador de la actividad mitocondrial, dado que estas organelas constituyen el sitio principal de formación de este radical libre y, consecuentemente, de ERO derivadas de éste como subproductos de la cadena respiratoria (Kroemer, 1998). Así se determinó, en las células esplénicas, un incremento en la formación de SO en los grupos tratados con IP (IP e IP

+ arsénico); lo cual indica que, de forma simultánea a la inhibición de la vía anaeróbica previamente observada en estos grupos, tiene lugar un aumento del metabolismo oxidativo propio de la mitocondria y de la respiración aeróbica para la obtención de ATP (Blanco y Blanco, 2011).

Adicionalmente, se determinó la concentración de grupos sulfhidrilos libres en las suspensiones celulares obtenidas, variable cuya relevancia ya ha sido previamente fundamentada en el apartado 4.4. Los valores dosados repitieron lo hallado con anterioridad sobre el tejido esplénico completo, ya que IP duplicó, con respecto al grupo control, la concentración de grupos tioles libres. En relación a esto, se conoce que el estado prooxidante previamente descrito desencadena mecanismos antioxidantes endógenos a partir de los cuales tienen lugar, entre otros, la producción *de novo* de GSH y la inducción de la autofagia de los agregados de proteínas mal plegadas o dañadas (PAOP) con aumento de los niveles de aminoácidos azufrados precursores (Onodera y Ohsumi, 2005). Este proceso de degradación, mediado por proteotoxicidad, es activado bajo condiciones de estrés oxidativo para favorecer la supervivencia de la célula (Ogata et al., 2006; Ding et al., 2007), lo cual se refleja en la viabilidad de las células tratadas con IP.

En cuanto al grupo IP + arsénico, éste ofrece valores por debajo de tratamiento IP, aunque aún significativamente superiores a los observados en control; lo cual indica que los efectos descritos para IP persisten, aunque la concentración total de grupos tioles se ve afectada por la captación de éstos por el arsénico trivalente (Valko et al., 2005). No obstante, la disponibilidad mayor de GSH en el citosol, implica además su transporte hacia la mitocondria, proceso esencial para proteger las proteínas mitocondriales de las ROS producidos *in situ* y para mantener íntegra la membrana mitocondrial (García-Ruiz et al., 1995; Lu, 2009). Por otra parte, el uso aislado de arsénico representa una disminución en la concentración de grupos tioles, respecto a control, coherente con la capacidad de los arsenicales trivalentes de interactuar con los sulfhidrilos libres de péptidos y proteínas (Valko et al., 2005). De esta manera el arsénico inhibe el accionar de diversas enzimas y cofactores, algunos de ellos involucrados en la actividad mitocondrial como el ácido lipóico, cofactor promotor del metabolismo aeróbico de la glucosa (Meng et al., 2010; Rana et al., 2012).

Adicionalmente, con la intención de verificar si la dosis de arsénico administrada conlleva a disfunción mitocondrial, se procedió a medir el potencial de membrana como variable predictiva de la viabilidad/apoptosis celular. Así se confirmó una caída del 23,08% en este parámetro en el grupo arsénico, respecto a control. En este sentido, existen diversos estudios que proponen al arsénico como un poderoso mitocondriotóxico, fundamentando su capacidad de inducir apoptosis a partir de la acción directa sobre la cadena respiratoria mitocondrial (Pelicano et al., 2003) y el poro de transición mitocondrial (mPTP, del inglés Mitochondrial Transition Pore), lo cual conduce a un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna y externa, la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3 (Larochette et al., 1999; Belzacq et al., 2001). Este evento trae aparejado una disminución del ATP y muerte celular (Skulachev, 2006).

En contrapartida, se ensayó el efecto del consumo oral de ácido clorogénico (AC), por ser el compuesto fenólico predominante en el extracto acuoso de IP (Cittadini et al., 2018). Los resultados obtenidos con AC muestran un incremento significativo del potencial de membrana, con respecto a control, efecto que amortigua la pérdida de actividad mitocondrial que tiene lugar con la administración de arsénico en el tratamiento AC + arsénico. En este sentido, estudios previos han descrito los efectos metabólicos del AC sobre la homeostasis de la glucosa, atribuyendo a este compuesto la capacidad de aumentar la sensibilidad celular a la insulina (Zuñiga et al., 2017; Ferrare et al., 2018). El consecuente ingreso incrementado de glucosa a la célula, hallado y discutido al analizar los efectos de IP sobre los esplenocitos, conlleva a un aumento en la presión metabólica inducida por la elevada concentración de sustrato que no se corresponde necesariamente con un incremento proporcional en los requerimientos energéticos de la célula (Green et al., 2004). Esta demanda en la función mitocondrial se traduce en una sobreproducción de anión superóxido a partir de oxígeno (Kroemer, 1998), efecto que también ha sido observado sobre las suspensiones de células esplénicas de animales tratados con IP y discutido en este apartado.

Como ensayo complementario, se analizó el estado de activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), factor de transcripción proinflamatorio y antiapoptótico. En efecto, se ha

descrito que los fenoles inhiben su activación, lo cual se corresponde con el accionar proapoptótico atribuido a algunos de estos compuestos y los diversos estudios que fundamentan su empleo como coadyuvantes en terapias oncológicas (Lin, 2007; Reuter et al., 2008). No obstante los resultados obtenidos en la presente tesis, muestran un efecto antiapoptótico del tratamiento IP representado por el incremento de la concentración de NF- κ B activo, hallazgo que se evidencia en la sobrevida de las células esplénicas provenientes de los animales tratados con IP e IP + arsénico.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten arribar a las siguientes conclusiones:

- ✓ Los tres extractos vegetales ensayados son fuentes de compuestos fenólicos (IP, LG y AQB en orden decreciente). El análisis de la biodisponibilidad de los mismos en los tejidos estudiados, al ser administrados por vía oral, indica un predominio de compuestos fenólicos en el compartimento vascular y una diferencia en la distribución tisular entre sexos, presentando las hembras concentraciones superiores en general.
- ✓ En el mismo modelo animal, se observa que LG tiene un efecto prooxidante sobre los tejidos hemolinfáticos analizados, a partir de una inducción desigual en la formación de ERO y peróxidos en machos y hembras. AQB, por su parte, redujo la peroxidación en sangre y bazo de ambos sexos, con regulación nitrosativa positiva en timo, aunque los efectos antioxidantes no fueron fenol-dependientes. Por último, IP exhibió también efectos disímiles según sexo, con machos que muestran algunos efectos antioxidantes, mientras que las hembras mostraron una susceptibilidad oxidativa.
- ✓ La biodisponibilidad de compuestos fenólicos en los tejidos estudiados se relacionó directamente con un aumento de la oxidación dosada.
- ✓ El arsenito de sodio, administrado por vía intraperitoneal, origina una pérdida dosis-dependiente de la viabilidad de los esplenocitos. Este efecto fue revertido por la ingesta oral (3 horas previas) de IP (50 mg/kg), mientras que AQB resultó tóxico *per se*, además de no proteger a las células frente a inmunotoxicidad por arsénico.
- ✓ La exposición a arsénico no resulta en un incremento de peróxidos en bazo, por lo que la inducción de estrés oxidativo no sería la vía involucrada en la pérdida de viabilidad celular. Por su parte, el aporte de IP genera niveles elevados de peróxidos y, consecuentemente de PAOP, por lo que los compuestos fenólicos aumentados con el consumo oral de este fitoextracto tendrían un efecto oxidante.
- ✓ La bioacumulación de arsénico en las muestras de bazo y la citotoxicidad resultante, tuvo lugar con una disminución simultánea de los grupos sulfhidrilos libres en las

células esplénicas y bazo en su totalidad y una alteración en el contenido y distribución del hierro. El tratamiento con IP incrementa los niveles de grupos sulfhidrilos libres y recupera los valores dosados de hierro.

- ✓ La exposición a DL50 de arsenito de sodio por vía intraperitoneal conlleva a una reducción en la función mitocondrial, por posible acción directa o por bloqueo de los cofactores de la vía aeróbica, de las células esplénicas que deriva en la muerte celular.
- ✓ El tratamiento con IP incrementa la captación de glucosa por los esplenocitos, lo cual aumentaría el metabolismo aeróbico por sobre el anaeróbico, con la consecuente disminución de lactato intracelular y la acumulación de SO. Este efecto, junto con la inducción de la actividad del NF- κ B, condicionaría una bioquímica celular diferente que responde manteniendo a la célula viable frente a la toxicidad del arsénico.

Estos hallazgos aportan evidencia científica sobre los cambios en biomarcadores involucrados en la inmunotoxicidad del arsénico y ofrecen, además, información en cuanto a la bioactividad de las plantas nativas argentinas y sus derivados, así como a su potencial uso frente a inmunotoxicidad por arsénico. En adición, los resultados descritos para IP resultan relevantes dado el elevado consumo de infusiones de esta planta en la República Argentina y otros países, lugares donde este fenómeno coexiste con la ingesta oral de agua y alimentos contaminados con arsénico.

CAPÍTULO 5: Bibliografía

Acharya S, Chaudhuri S, Chatterjee S, Kumar P, Begum Z, Dasgupta S, Flora SJ, Chaudhuri S. Immunological profile or arsenic toxicity: a hint towards arsenic-induced carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010; 11(2):479-90.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Ministerio de Salud de la Nación. Bebidas hídricas, aguas y aguas gasificadas. Agua potable. En: Código Alimentario Argentino. Buenos Aires: ANMAT. 2012.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for arsenic – draft for public comment. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. 2007.

Ahsan H, Perri M, Rahman A, Parvez F, Stute M, Zheng Y, Miltron AH, Brand-Rauf P, Van-Gree A, Graziano J. Associations of drinking water and urinary arsenic levels and skin lesions in Bangladesh. *J Occup Environ Med*. 2000; 42:1195-201.

Ait Baddi G, Cegarra J, Merlina G, Revel JC, Hafidi M. Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste-wheat straw mixture. *J Hazard Mater*. 2009; 165(1-3):1119-23.

Al-Hanbali M, Ali D, Bustami M, Abdel-Malek S, Al-Hanbali R, Alhussainy T, Qadan F, Matalka KZ. Epicatechin suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-10 production with NF-kappaB nuclear translocation in whole blood stimulated system. *Neuro Endocrinol Lett*. 2009; 30:131-8.

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

Arçari DP, Bartchewsky WJr, dos Santosa TW, Oliveiraa KA, De Oliveiraa CC, Gotardo EM, Pedrazzoli J Jr, Gambero A, Ferraz LFC, Carvalho P de O, Ribeiro ML. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 335:110-5.

Baeza I, De Castro NM, Arranz L, De la Fuente M. Soybean and green tea polyphenols improve immune function and redox status in very old ovariectomized mice. *Rejuvenation Res*. 2010; 13(6):665-74.

Barboza GE, Cantero JJ, Núñez C, Pacciaroni A, Ariza Espinar L. Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*. 2009; 34(1-2):7–365.

Belzacq AS, El Hamel C, Vieira HL, Cohen I, Haouzi D, Metivier D, Marchetti P, Brenner C, Kroemer G. Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene*. 2001; 20:7579-87.

Blanco A, Blanco G. *Química Biológica*. 9^{na} ed. Grupo Ilhsa S.A.: Argentina. 2011.

Blanco MC, Paolini JD, Morrás HJ, Fiorentino CE, Sequeira M. Content and distribution of arsenic in soils, sediments and groundwater environments of the southern Pampa region, Argentina. *Environ Toxicol.* 2006; 21(6):561-74.

Blanes PS, Buchhamer EE, Giménez MC. Natural contamination with arsenic and other trace elements in groundwater of the Central-West region of Chaco, Argentina. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2011; 46(11):1197-206.

Bojić M, Haas VS, Šarić D, Maleš Z. Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). *J Anal Methods Chem.* 2013; 2013.

Bongiovanni GA, Soria EA, Eynard AR. Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(6):971-6.

Borneo R, León AE, Aguirre A, Ribotta P, Cantero JJ. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chem.* 2009; 112:664-70.

Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem.* 1972; 46(2):639-53.

Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol.* 2011; 136:378-84.

Bragança VL, Melnikov P, Zandoni LZ. Trace elements in different brands of yerba mate tea. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 144(1-3):1197-204.

Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, Di Benedetto G, Pezzino S, Bernardini R. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutr J.* 2008; 7:29.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56:317-33.

Bravo L, Goya L, Lecumberri E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Res Int.* 2007; 40(3):393-405.

Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays.* 2007; 29(2):166-77.

Brückner M, Westphal S, Domschke W, Kucharzik T, Lügering A. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate shows therapeutic antioxidative effects in a murine model of colitis. *J Crohns Colitis.* 2012; 6(2):226-35.

Bundschuh J, Litter MI, Parvez F, Román-Ross G, Nicolli HB, Jean JS, Liu CW, López D, Armienta MA, Guilherme LR, Cuevas AG, Cornejo L, Cumbal L, Toujaguez R. One century of arsenic exposure in Latin América: A review of history and occurrence from 14 countries. *Sci Total Environ.* 2012; 429:2-35.

Campos AR, Lima RC Jr, Uchoa DE, Silveira ER, Santos FA, Rao VS. Pro erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. *J Ethnopharmacol.* 2006; 104:240-4.

Carducci CN, Dabas PC, Muse JO. Determination of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in *Ilexparaguariensis* (St.H.), a plant used to prepare tea in South America. *J AOAC Intern.* 2000; 83:1167-73.

Cesta MF. Normal structure, function and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006; 34(5):455-65.

Chadburn A. The spleen: anatomy and anatomical function. *Semin Hematol.* 2000; 37:13-21.

Cherniack EP. A berry thought-provoking idea: the potential role of plant polyphenols in the treatment of age-related cognitive disorders. *Br J Nutr.* 2012; 5:1-7.

Chinen J, Shearer WT. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2):195-203.

Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Llorach R, Rotches-Ribalta M, Guillén M, Casas R, Arranz S, Valderas-Martinez P, Portoles O, Corella D, Tinahones F, Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C, Estruch R. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(2):326-34.

Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Ranger-Moore J, Cordova CA, Mikhael DM, Briehl MM, Alberts DS. Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenon e intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(8):1662-6.

Cicconi L, Lo-Coco F. Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Ann Oncol.* 2016; 27:1474-81.

Cittadini MC, García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Valentich MA, Repossi G, Soria EA. Modulation of fatty acids and interleukin-6 in glioma cells by South American tea extracts and their phenolic compounds. *Nutr Cancer.* 2018; 70:267-77.

Clarke JO, Mullin GE. A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation. *Nutr Clin Pract.* 2008; 23(1):49-62.

Clifford MN, Van der Hooft JJ, Crozier A. Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98:1619-30.

Colpo AC, de Lima ME, Maya-López M, Rosa H, Márquez-Curiel C, Galván-Arzate S, Santamaría A, Folmer V. Compounds from *Ilex paraguariensis* extracts have antioxidant effects in the brains of rats subjected to chronic immobilization stress. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2017; 42(11):1172-8.

Concha G, Vogler G, Nermell B, Vahter M. Intra-individual variation in the metabolism of inorganic arsenic. *Int Arch Occup Environ Health.* 2002; 75(8):576-80.

Cordero H, Morcillo P, Martínez S, Meseguer J, Pérez-Sirvent C, Chaves-Pozo E, Martínez-Sanchez MJ, Cuesta A, Ángeles Esteban M. Inorganic arsenic causes apoptosis cell death and immunotoxicity on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar Pollut Bull.* 2018; 128:324-32.

Cui X, Okayasu R. Arsenic accumulation, elimination and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46:3646-50.

D'Archivio M, Filesi C, Varí R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversias. *Int J Mol Sci.* 2010; 11:1321-42.

Das S, Pan D, Bera AK, Rana T, Bhattacharya D, Bandyopadhyay S, De S, Sreevatsava V, Bhattacharya S, Das SK, Bandyopadhyay S. Sodium arsenite mediated immuno-disruption through alteration of transcription profile of cytokines in chicken splenocytes under *in vitro* system. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(1):171-6.

De Araújo DP, Nogueira PCN, Santos ADC, Costa RO, de Lucena JD, Jataí Gadelha-Filho CV, Lima FAV, Neves KRT, Leal LKAM, Silveira ER, Viana GSB. *Aspidosperma pyriforme* Mart: neuroprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects in a Parkinson's disease model in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2018; en prensa. doi: 10.1111/jphp.12866.

Denzoin Vulcano LA, Soraci AL, Tapia MO. Homeostasis del glutatión. *Bioquím Clín Latinoam.* 2013; 47(3):529-39.

Deutsch HF, Evenson MA, Drescher P, Sparwasser C, Madsen PO. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. *J Pharm Biomed Anal.* 1994; 12:1283-7.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Hou YF, Melan MA, Chen X, Stolz DB, Shao ZM, Yin XM. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced atophagy on cell survival. *J Biol Chem.* 2007; 282:4702-10.

Drobna Z, Walton FS, Harmon AW, Thomas DJ, Styblo M. Interspecies differences in metabolism of arsenic by cultured primary hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010a; 245: 47-56.

Drobna Z, Walton FS, Paul DS, Xing W, Thomas DJ, Styblo M. Metabolism of arsenic in human liver: the role of membrane transporters. *Arch Toxicol.* 2010b; 84:3-16.

Dueñas-Laita A, Pérez-Miranda M, González-López MA, Martín-Escudero JC, Ruiz-Mambrilla M, Blanco-Varela J. Acute arsenic poisoning. *Lancet.* 2005; 365:1982.

Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. 4^{ta} ed. Editorial Médica Panamericana, S.A.: Argentina. 2008.

Emadi A, Gore SD. Arsenic trioxide – an old drug rediscovered. *Blood Rev.* 2010; 276: 1118-28.

Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *J Nutr.* 2008; 138(12):2309-15.

Farias-Eisner R, Sherman MP, Aeberhard E, Chaudhuri G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:9407-11.

Ferrare K, Bidet LPR, Awwad A, Poucheret P, Cazals G, Lazennec F, Azay-Milhau J, Tournier M, Lajoix AD, Tusch D. Increase in insulin sensitivity by the association of chicoric acid and chlorogenic acid contained in a natural chicoric acid extract (NCRAE) of chicory (*Cichorium intybus* L.) for an antidiabetic effect. *J Ethnopharmacol.* 2018; 215:241-8.

Ferrario D, Gribaldo L, Hartung T. Arsenic Exposure and Immunotoxicity: a Review Including the Possible Influence of Age and Sex. *Curr Environ Health Rep.* 2016; 3(1):1-12.

Ferruzzi MG, Bordenave N, Hamaker BR. Does flavor impact function? Potential consequences of polyphenol-protein interactions in delivery and bioactivity of flavan-3-ols from foods. *Physiol Behav.* 2012; 107(4):591-7.

Francisca FM, Carro-Pérez ME. Assesment of natural arsenic in groundwater in Córdoba Province, Argentina. *Environ Geochem Health.* 2009; 31(6):673-82.

García CC, Acosta EG, Carro AC, Fernández Belmonte MC, Bomben R, Duschatzky CB, Perotti M, Schuff C, Damonte EB. Virucidal activity and chemical composition of essential oils from aromatic plants of central west Argentina. *Nat Prod Commun.* 2010; 5(8):1307-10.

Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor kappa- β : studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1995; 48(5):825-34.

Ghosh P, Banerjee M, Giri AK, Ray K. Toxicogenomics of arsenic: classical ideas and recent advances. *Mutat Res.* 2008; 659:293-301.

Giménez M, Benítez M, Osicka R, Castro M. Determinación de arsénico total en aguas subterráneas del departamento Comandante Fernández (Chaco, Argentina). *Inf Tecnol.* 2000; 11(2):19-22.

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

Goyenechea M. Sobre la nueva enfermedad descubierta en Bell Ville. *Rev Med Rosario.* 1917; 7:485.

Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004; 53(1):S110-8.

Green LC, Wagner DA, Glogowski-Skipper J, Wishnok PL, Tannenbaum SR. Analysis of nitrite, nitrate, and [15N] in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126(1):131-8.

Grinyó JM, Cruzado JM, Bestard O, Vidal-Castañeira JR, Torras J. Immunosuppression in the era of biological agents. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 741:60-72.

Hernandez A, Marcos R. Genetic variations associated with interindividual sensitivity in the response to arsenic exposure. *Pharmacogenomics.* 2008; 9:1113-32.

Hogan RB, Eagle H. The pharmacologic basis for the widely varying toxicity of arsenicals. *J Pharmacol Exp Therapeut.* 1944; 80:93-113.

Hossain K, Akhand AA, Kato M, Du J, Takeda K, Wu J, Takeuchi K, Liu W, Suzuki H, Nakashima I. Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-Jun amino-terminal kinase. *J Immunol.* 2000; 15;65(8):4290-7.

Hughes MF, Beck BD, Chen Y. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol Sci.* 2011; 123(2):305-32.

Hunt KM, Srivastava RK, Elmets CA, Athar M. The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer. *Cancer Lett.* 2014; 354:211-19.

Hussein GME, Matsuda H, Nakamura S, Hamao M, Akiyama T, Tamura K, Yoshikawa M. Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Promotes Satiety and Body Weight Lowering in Mice: Involvement of Glucagon-Like Peptide-1. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34(12):1849-55.

InfoStat. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2018.

International Agency for Research of Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans: some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. World Health Organization Press, Lyon, France. 2004; 84.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010; 327(5963):291-5.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. Immunobiology: The immune system in health and disease, fifth ed. Garland Science, New York. 2001

Jia J, Wu YH, Zhou XQ, Wang Y. Effects of testosterone propionate on oxidative stress and the expression of spleen cytokine genes in endosulfan-treated mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2012; 31,17-26.

Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodes CJ, Valko M. Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol.* 2011; 31(2):95-107.

Kabelitz D. Toll-like receptors: Recognition receptors of the innate immune system and target structures for therapeutical intervention. *Med Monatsschr Pharm.* 2012; 35(7):238-44.

Kang BY, Lee SW, Kim TS. Stimulation of interleukin-12 production in mouse macrophages via activation of p38 mitogen-activated protein kinase by alpha2-adrenoceptor agonists. *Eur J Pharmacol.* 2003; 467:223-31.

Karasawa K, Uzuhashi Y, Hirota M, Otani H. A matured fruit extract of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) stimulates the cellular immune system in mice. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(20):11287-93.

Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison: Principios de medicina interna. 19th ed. McGraw-Hill Interamericana Editores: México DF. 2016.

Kawai Y. Immunochemical detection of food-derived polyphenols in the aorta: macrophages as a major target underlying the anti-atherosclerotic activity of polyphenols. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011; 75(4):609-17.

Kenyon EM, Hughes MF, Adair BM, Highfill JH, Crecelius EA, Clewell HJ, Yager JW. Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in C57BL6 mice following subchronic exposure to arsenate in drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 232(3):448-55.

Khettal B, Kadri N, Tighilet K, Adjebli A, Dahmoune F, Maiza-Benabdeslam F. Phenolic compounds from Citrus leaves: antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *J Complement Integr Med*. 2017; 1;14(1).

Kim HY, Kim OH, Sung MK. Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quercetin and kaempferol in healthy volunteers. *J Am Coll Nutr*. 2003; 22(3):217-23.

Kitchin KT, Wallace K. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *J Inorg Biochem*. 2008; 102(3):532-9.

Klein GA, Stefanuto A, Boaventura BC, de Moraes EC, Cavalcante L da S, de Andrade F, da Silva EL. Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Improves Glycemic and Lipid Profiles of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes Individuals: A Pilot Study. *J Am Coll Nutr*. 2011; 30(5):320-32.

Kroemer G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ*. 1998; 5:547.

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

Lambert JD, Sang S, Yang CS. Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol*. 2007; 20(4): 5835.

Larochette N, Decaudin D, Jacotot E, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Zamzami N, Xie Z, Reed J, Kroemer G. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res*. 1999; 249:413-21.

Le Bourvellec C, Renard CM. Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012; 52(3):213-48.

Li B, Li X, Zhu B, Zhang X, Wang Y, Xu Y, Wang H, Hou Y, Zheng Q, Sun G. Sodium arsenite induced reactive oxygen species generation, nuclear factor (erythroid-2 related) factor 2 activation, heme oxygenase-1 expression, and glutathione elevation in Chang human hepatocytes. *Environ Toxicol*. 2013; 28(7):401-10.

Li G, Zeng X, Xie Y, Cai Z, Moore JC, Yuan X, Cheng Z, Ji G. Pharmacokinetic properties of isorhamnetin, kaempferol and quercetin after oral gavage of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. in rats using a UPLC-MS method. *Fitoterapia*. 2012; 83(1):182-91.

Li Y, Gao Y, Zhao L, Wei Y, Feng H, Wang C, Wei W, Ding Y, Sun D. Changes in serum thioredoxin among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012; 259(1):124-32.

Lièvre D, Bertin PN, Lett MC. Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie*. 2009; 91(10):1229-37.

Lin JK. Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 595:227-43.

Loffredo CA, Aposhian HV, Cebrian ME, Yamauchi H, Silbergeld EK. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ Res.* 2003; 92:85-91.

Lozna K, Biernat J. The occurrence of arsenic in the environment and food. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2007; 59(1):19-31.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2):42-59.

Lu Z, Zhang Y, Liu H, Yuan J, Zheng Z, Zou G 2007. Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum albumin and hemoglobin. *J Fluoresc.* 2007; 17:580-7.

Luz ABG, da Silva CHB, Nascimento MVPS, de Campos Facchin BM, Baratto B, Fröde TS, Reginatto FH, Dalmarco EM. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. *Int Immunopharmacol.* 2016; 36:165-72.

Magrone T, Marzulli G, Jirillo E. Immunopathogenesis of neurodegenerative diseases: current therapeutic models of neuroprotection with special reference to natural products. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(1):34-42.

Mahmud H, Föller M, Lang F. Arsenic-induced suicidal erythrocyte death. *Arch Toxicol.* 2009; 83(2):107-13.

Mann KK, Wallner B, Lossos IS, Miller Jr WH. Darinaparsin: a novel organic arsenical with promising anticancer activity. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009; 18:1727-34.

Marchesino MA, Cortez MV, Albrecht C, Aballay LR, Soria EA. Modificaciones en el nivel de anión superóxido en leche materna, según la ingesta de flavonoides y carotenoides. *Salud Pública Mex.* 2017; 59(5):526-31.

Marcos A. Inmunonutrición: en la salud y la enfermedad. Editorial Médica Panamericana, S.A.: España. 2011.

Marshall G, Ferreccio C, Yuan Y, Bates MN, Steinmaus C, Selvin S, Liaw J, Smith AH. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(12):920-8.

Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, Kligerman AD. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem Res Toxicol.* 2001; 14:355-61.

Matteucci E, Biasci E, Giampietro O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetol.* 2001; 38: 187-9.

Mebius RE, Kraal G. Structure and functions of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(8):606-16.

Medzhitov. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007; 449(7164):819-26.

Medzhitov R, Shevach EM, Trinchieri G, Mellor AL, Munn DH, Gordon S, Libby P, Hansson GK, Shortman K, Dong C, Gaborilovich D, Gabryšová L, Howes A, O'Garra A. Highlights of 10 years of immunology in *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol.* 2011; 23;11(10):693-702.

Meng D, Wang X, Chang Q, Hitron A, Zhang Z, Xu M, Chen G, Luo J, Jiang B, Fang J, Shi X. Arsenic promotes angiogenesis *in vitro* via a heme oxygenase-1 dependent mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 244(3):291-9.

Middleton DR, Watts MJ, Hamilton EM, Fletcher T, Leonardi GS, Close RM, Exley KS, Crabbe H, Polya DA. Prolonged exposure to arsenic in UK private water supplies: toenail, hair and drinking water concentrations. *Environ Sci Process Impacts*. 2016; 18(5):562-74.

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

Mitaine AC, Mesbah K, Richard B, Petermann C, Arrazola S, Moretti C, Zèches-Hanrot M, Men-Olivier LL. Alkaloids from *Aspidosperma* species from Bolivia. *Planta Med*. 1996; 62(5):458-61.

Mitaine-Offer AC, Sauvain M, Valentin A, Callapa J, Mallié M, Zèches-Hanrot M. Antiplasmodial activity of *aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomedicine*. 2002; 9(2):142-5.

Mocchegiani E, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Piacenza F, Lattanzio F, Basso A. Is there a possible single mediator in modulating neuroendocrine thymus interaction in ageing?. *Curr Aging Sci*. 2013; 6:99-107.

Molin M, Ulven SM, Meltzer HM, Alexander J. Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology-review focusing on seafood arsenic. *J Trace Elem Med Biol*. 2015; 31:249-59.

Mondal D, Banerjee M, Kundu M, Banerjee N, Bhattacharya U, Giri AK, Ganguli B, Sen RS, Polya DA. Comparison of drinking water, raw rice and cooking of rice as arsenic exposure routes in three contrasting areas of West Bengal, India. *Environ Geochem Health*. 2010; 32:463-77.

Montelescaut E, Vermeersch V, Commandeur D, Huynh S, Danguy des Deserts M, Sapin J, Ould-Ahmed M, Drouillard I. Acute arsenic poisoning. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014; 72(6):735-8.

Murakami A. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. *Archiv Biochem Biophys*. 2014; 557:3-10.

Naranmandura H, Carew MW, Xu S, Lee J, Leslie EM, Weinfeld M, Le XC. Comparative toxicity of arsenic metabolites in human bladder cancer EJ-1 cells. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24(9):1586-96.

Nasreddine L, Parent-Massin D. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicol Lett*. 2002; 127(1-3):29-41.

Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HV, Graziano JH, Thompson C, Suk WA. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect*. 2013; 121:295-302.

Németi B, Anderson ME, Gregus Z. Glutathione synthetase promotes the reduction of arsenate via arsenolysis of glutathione. *Biochimic*. 2012; 94(6):1327-33.

Ng JC. Environmental contamination of arsenic and its toxicological impact on humans. *Environ Chem*. 2005; 2(3):146-60.

Nicolli HB, García JW, Falcón CM, Smedley PL. Mobilization of arsenic and other trace elements of health concern in groundwater from the Salí River Basin, Tucumán Province, Argentina. *Environ Geochem Health*. 2012; 34(2):251-62.

Novák Z, Bérces A, Rontó G, Pállinger E, Dobozy A, Kemény L. Efficacy of different UV-emitting light sources in the induction of T-cell apoptosis. *Photochem Photobiol*. 2004; 79(5):434-9.

Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*. 2007; 151:580-90.

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2006; 26:9220-31.

Onodera J, Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem*. 2005; 280:31582-6.

O'Reilly J, Watts MJ, Shaw RA, Marcilla AL, Ward NI. Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina. *Environ Geochem Health*. 2010; 32(6):491-515.

Orloff K, Mistry K, Metcalf S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009; 12(7):509-24.

Patra PH, Bandyopadhyay S, Bandyopadhyay MC, Mandal TK. Immunotoxic and genotoxic potential of arsenic and its chemical species in goats. *Toxicol Int*. 2013; 20(1):6-10.

Pelicano H, Feng, L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang, P. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2003; 278:37832-9.

Petrick JS, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DE, Vasken Aposhian H. Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000; 163:203-7.

Ramos Elizagaray SI, Soria EA. Arsenic immunotoxicity and immunomodulation by phytochemicals: Potential relations to develop chemopreventive approaches. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2014; 8:92-103.

Ramos Elizagaray SI, Quiroga PL, Pérez RD, Sosa C, Pérez CA, Bongiovanni GA, Soria EA. Effect of the aqueous extract of *Lantana grisebachii* Stuck. against bioaccumulated arsenic-induced oxidative and lipid dysfunction in rat splenocytes. *J Diet Suppl*. En prensa.

Rana T, Bera AK, Das S, Bhattacharya D, Pan D, Das SK. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in male wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2012; 26(3):109-16.

Ratnaik RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J*. 2003; 79(933):391-6.

Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76,40-1351.

Ríos JL, Francini F, Schinella GR. Natural products for the treatment of type 2 Diabetes mellitus. *Planta Med.* 2015; 81(12-13):975-94.

Rivelli DP, Almeida RL, Ropke CD, Barros SBM. Hydrolysis influence on phytochemical composition, antioxidant activity, plasma concentration, and tissue distribution of hydroethanolic *Ilex paraguariensis* extract components. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(16):8901-7.

Rodríguez Vaquero MJ, Tomassini Serravalle LR, Manca de Nadra MC, Strasser de Saad AM. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control.* 2010; 21(5):779-85.

Rubatto Birri PN, Pérez RD, Cremonuzzi D, Pérez CA, Rubio M, Bongiovanni GA. Association between As an Cu renal cortex accumulation and physiological and histological alterations after chronic arsenic intake. *Environ Res.* 2010; 110(5):417-23.

Rugale C, Delbosc S, Mimran A, Jover B. Simvastatin reverses target organ damage and oxidative stress in Angiotensin II hypertension: comparison with apocynin, tempol, and hydralazine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 50: 293-8.

Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol.* 2000; 16:91-8.

Samikkannu T, Chen CH, Yih LH, Wang AS, Lin SY, Chen TC, Jan KY. Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chem Res Toxicol.* 2003; 16(3):409-14.

Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: Consequences on T-Cell-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc.* 2010; 69(4):636-43.

Scotta AV, Bongiovanni GA, Soria EA. Actividad moduladora *in vitro* de extractos acuosos de plantas americanas sobre la toxicidad inducida por clorpirifos en esplenocitos murinos. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2017; 74:325-30.

Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:640754.

Sharma VK, Sohn M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ Int.* 2009; 35(4):743-59.

Singh N, Kumar D, Sahu AP. Arsenic in the environment: Effects on human health and possible prevention. *J Environ Biol.* 2007; 28(2):359-65.

Sinha D, Dey S, Bhattacharya RK, Roy M. *In vitro* mitigation of arsenic toxicity by tea polyphenols in human lymphocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007; 26(3):207-20.

Skulachev VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis.* 2006; 11:473-85.

Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol.* 2008; 27(4):341-6.

Soria EA, Eynard AR, Bongiovanni GA. Cytoprotective effects of silymarin on epithelial cells against arsenic-induced apoptosis in contrast with quercetin cytotoxicity. *Life Sci.* 2010; 87(9-10):309-15.

Soria EA, Quiroga PL, Albrecht C, Ramos Elizagaray SI, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Development of an Antioxidant Phytoextract of *Lantana grisebachii* with Lymphoprotective Activity against *In Vitro* Arsenic Toxicity. *Adv Pharmacol Sci.* 2014; 2014:416761.

Soria EA, Pérez RD, Queralt I, Pérez CA, Bongiovanni GA. Immunotoxicological effects of arsenic bioaccumulation on spatial metallomics and cellular enzyme response in the spleen of male Wistar rats after oral intake. *Toxicol Lett.* 2017; 266:65-73.

Steiniger BS. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology.* 2015; 145(3):334-45.

Strotmann UJ, Butz B, Bias WR. The dehydrogenase assay with resazurin: practical performance as a monitoring system and Ph-dependent toxicity of phenolic compounds. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1993; 25(1):79-89.

Su S, Zeng X, Bai L, Li L, Duan R. Arsenic biotransformation by arsenic-resistant fungi *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1. *Sci Total Environ.* 2011; 409(23):5057-62.

Surh YJ. Xenohormesis mechanisms underlying chemopreventive effects of some dietary phytochemicals. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1229:1-6.

Suzuki K, Kori S, Morikawa M, Takagi A, Namiki H. Oxidative stress-mediated bimodal regulation of polymorphonuclear leukocyte spreading by polyphenolic compounds. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10(11):1448-55.

Terao J, Mukai R. Prenylation modulates the bioavailability and bioaccumulation of dietary flavonoids. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 559:12-6.

Thomas DJ, Li J, Waters SB, Xing W, Adair BM, Drobna Z, Devesa V, Styblo M. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and methylation of arsenicals. *Exp Biol Med.* 2007; 232(1):3-13.

Tiron A, Vasilescu C. Role of the spleen in immunity. Immunologic consequences of splenectomy. *Chirurgia (Bucur).* 2008; 103(3):255-63.

Tiwari R, Latheef SK, Ahmed I, Iqbal HMN, Bule MH, Dhama K, Samad HA, Karthik K, Alagawany M, El-Hack MEA, Yatoo MI, Farag MR. Herbal immunomodulators, a remedial panacea for the designing and developing effective drugs and medicines: Current scenario and future prospects. *Curr Drug Metab.* 2018. En prensa. doi: 10.2174/1389200219666180129125436.

Tournel G, Houssaye C, Humbert L, Dhorne C, Gnemmi V, Bécart-Robert A, Nisse P, Hédouin V, Gosset D, Lhermitte M. Acute arsenic poisoning: Clinical, toxicological, histopathological, and forensic features. *J Forensic Sci.* 2011; 56(1):S275-9.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(8):1343-74.

Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2010; 2(12):1231-46.

- Tseng CH. A review on environmental factors regulating arsenic methylation in humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 235(3):338-50.
- Tsuda T, Babazono A, Yamamoto E, Kurumatani N, Mino Y, Ogawa T, Kishi Y, Aoyama H. Ingested arsenic and internal cancer: a historical cohort study followed for 33 years. *Am J Epidemiol.* 1995; 141(3):198-209.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12(10):1161-208.
- Vahter M. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci Prog.* 1999; 82(1):69-88.
- Vahter M, Concha G. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol and Toxicol.* 2001; 89:1-5.
- Vitaglione P, Barone Lumaga R, Ferracane R, Radetsky I, Mennella I, Schettino R, Koder S, Shimoni E, Fogliano V. Curcumin bioavailability from enriched bread: the effect of microencapsulated ingredients. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(13):3357-66.
- Wang J, Wang G, Ansari GA, Khan MF. Activation of oxidative stress-responsive signaling pathways in early splenotoxic response of aniline. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 230(2):227-34.
- Wang L, Xu ZR, Jia XY, Han XY. Effects of dietary arsenic levels on serum parameters and trace mineral retentions in growing and finishing pigs. *Biol Trace Elem.* 2006; 113:155-64.
- Watanabe T, Hirano S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 2013; 87(6):969-79.
- Waters SB, Devesa V, Del Razo LM, Styblo M, Thomas DJ. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chem Res Toxicol.* 2004; 17:404-9.
- Wnuk M, Lewinska A, Oklejewicz B, Bugno M, Slota E, Bartosz G. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat Res- Gen Tox En.* 2009; 679:18-23.
- World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking –water quality. 4th ed. WHO: Malta. 2011.
- Wrobel K, Wrobel K, Urbina EM. Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, and nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (Mate) by ETA-AAS. *Biol Trace Elem Res.* 2000; 78:271–80.
- Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci.* 2011; 100:3655-81.
- Wu H, Krishnamohan M, Lam PK, Ng JC. Urinary arsenic speciation profiles in mice subchronically exposed to low concentrations of sodium arsenate in drinking water. *Kaohsiung J Med Sci.* 2011; 27(9):417-23.
- Xiao J, Kai G. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012; 52:85-101.

Xu H, McClain S, Medina S, Lauer FT, Douillet C, Liu KJ, Hudson LG, Stýblo M, Burchiel SW. Differential sensitivities of bone marrow, spleen and thymus to genotoxicity induced by environmentally relevant concentrations of arsenite. *Toxicol Lett.* 2016; 262:55-61.

Xu H, Medina S, Lauer FT, Douillet C, Liu KJ, Stýblo M, Burchiel SW. Genotoxicity induced by monomethylarsonous acid (MMA+3) in mouse thymic developing T cells. *Toxicol Lett.* 2017; 279:60-66.

Yanai H, Ban T, Taniguchi T. High-mobility group box family of proteins: Ligand and sensor for innate immunity. *Trends Immunol.* 2012; 33(12):633-40.

Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem.* 2006; 281:30299-304.

Yoshida T, Yamauchi H, Sun GF. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 198:243-52.

Zhou X, Sun X, Mobarak C, Gandolfi AJ, Burchiel SW, Hudson LG, Liu KJ. Differential binding of monomethylarsonous acid compared to arsenite and arsenic trioxide with zinc finger peptides and proteins. *Chem Res Toxicol.* 2014; 27(4):690-8.

Zuñiga LY, Aceves-de la Mora MCA, González-Ortiz M, Ramos-Núñez JL, Martínez-Abundis E. Effect of Chlorogenic Acid Administration on Glycemic Control, Insulin Secretion, and Insulin Sensitivity in Patients with Impaired Glucose Tolerance. *J Med Food.* 2017. doi: 10.1089/jmf.2017.0110.

ANEXOS

ANEXO 1: Producción Científica

A. Producción científica inherente a la tesis

CAPÍTULO DE LIBRO:

- **Canalis AM**, Soria EA. Estudio fitofarmacológico de antioxidantes vegetales con potencial quimiopreventivo antitumoral por efectos directos e inmunomediados. En: INC. Informes finales segunda cohorte de becarios: Becas de formación inicial en investigación en cáncer 2012-2013 (1° ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional del Cáncer. 2014, pp. 31-39. ISBN 978-987-45494-2-6.

PUBLICACIONES CON REFERATO:

- **Canalis AM**, Cittadini MC, Albrecht C, Soria EA. Antioxidant sex-related effects of the *Aspidosperma quebracho-blanco* extract on murine hemolymphatic tissues compared to *Lantana grisebachii* and *Ilex paraguariensis* extracts. Indian J Exp Biol. 2014; 52(9):882-9.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS:

- **Canalis AM**, Scotta AV, Miranda AR, Bongiovanni GA, Soria EA. Efecto de la ingesta de productos vegetales sobre la viabilidad de esplenocitos expuestos a toxicidad aguda por arsénico. III Congreso de Biofarmacia y Farmacocinética. Córdoba, Argentina. 2015.
- **Canalis AM**, Cittadini MC, Albrecht C, Soria EA. Dimorphism by sex in hemolymphatic distribution of polyphenols and redox response of mice treated with native plant extracts. VI International Conference on Polyphenols and Health. Buenos Aires, Argentina. 2013.

B. Otra producción científica

PUBLICACIONES CON REFERATO:

- Albrecht C, Cittadini MC, Guzmán ML, **Canalis AM**, Valentich MA, Olivera ME, Soria EA. Bioavailability of phenolic compounds and redox state of murine liver and kidney as sex-dependent responses to phytoextracts. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2017; 74(4):338-44.
- Cittadini MC, **Canalis AM**, Albrecht C, Soria EA. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. Nutr Neurosci. 2015; 18(7):316-22.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS:

- Peralta MI, Fuentes KN, Carrizo DL, **Canalis AM**, Albrecht C. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de tomates frescos y en conservas artesanales obtenidos de cultivos orgánicos y convencionales”. XVIII Jornada de Investigación Científica de la FCM. Córdoba, Argentina. 2017.
- Miranda AR, **Canalis AM**, Serra SV, Soria EA. Análisis multidimensional de los efectos deseados y colaterales del ácido clorogénico en neurotoxicidad aguda inducida por arsénico en ratones. III Congreso de Biofarmacia y Farmacocinética. Córdoba, Argentina. 2015.
- Cittadini MC, Albrecht C, **Canalis AM**, Valentich MA, Repposi G, Soria EA. Blood phenolics levels as biomarkers of its concentration and bioactivity on central nervous system of mice exposed to plant infusions. Oxygen Club of California World Congress 2015: Oxidants and antioxidants in biology. Valencia, España. 2015.
- Albrecht C, **Canalis AM**, Cittadini MC, Valentich MA, Perez RD, Soria EA. Effect of dietary polyphenols on metal homeostasis and lipid oxidation of murine liver. Oxygen Club of California World Congress 2015: Oxidants and antioxidants in biology. Valencia, España. 2015.

- Miranda AR, Leonangeli S, Cittadini MC, Canalis AM, Albrecht C, Soria EA. Weight and redox effects of infusive phytoextracts on overweight female mice treated for fifteen days. 3° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina, 2014.
- Albrecht C, **Canalis AM**, Cittadini MC, Soria EA. Bioavailability of Phytochemicals in Murine Metabolic Organs, After Consumption of Infusions of Argentinean Native Plants. VI International Conference on Polyphenols and Health. Buenos Aires, Argentina. 2013.
- Cittadini MC, **Canalis AM**, Albrecht C, Soria EA. Sex-dependent changes in the level of reactive species and phenols in brain regions of mice treated with plant extracts. VI International Conference on Polyphenols and Health. Buenos Aires, Argentina. 2013.

ANEXO 2: Modelo Animal N° 1

INDIVIDUO	Sexo	Tratamiento	Observaciones	Peso Semana 0	Peso Semana 1	Peso Semana 2	Peso Semana 3	Peso Semana 4	Peso Bazo	Peso Timo
1	Macho	Control	Diarrea semana 4	16.2	19	17	22	23	0.113	0.0321
2	Macho	Control	Diarrea semana 4	17.8	20.5	18	22	24.5	0.1315	0.0242
3	Macho	Control	Diarrea semana 4	14.6	18	16	23	24	0.14	0.0547
4	Hembra	Control		23	21	22	22	21.5	0.1549	0.0561
5	Hembra	Control		16.4	16	19.5	21	21	0.1281	0.0639
6	Hembra	Control		17.1	17	20	21	20.5	0.1157	0.0597
7	Macho	LG	Pelo rosado. Epistótono	22.2	24	21	22	25	0.1346	0.0387
8	Macho	LG	Pelo rosado. Epistótono	19.4	20	19.5	20.5	21	0.0825	0.0307
9	Macho	LG	Pelo rosado. Epistótono	19	21.5	21	22	22.5	0.1026	0.0397
10	Hembra	LG	Epistótono	22.9	23	22	22.5	23	0.1197	0.0452
11	Hembra	LG	Epistótono	30.8	20	21	22	22	0.1181	0.0897
12	Hembra	LG	Epistótono	16.5	16	20	20	20	0.142	0.0741
13	Macho	AQB	Mucha sangre	27.8	27	27.5	26	25	0.1045	0.0225
14	Macho	AQB		28.1	28.5	28	26	27	0.0823	0.0366
15	Hembra	AQB		18.2	19	18.5	21	20	0.1119	0.0548
16	Hembra	AQB		17.7	19	20	20.5	19.5	0.1323	0.0814
17	Hembra	AQB		20.8	20.5	20	20.5	19.5	0.1027	0.0396
18	Macho	IP		19.2	21	21	23	22	0.0811	0.0573
19	Macho	IP		24.3	24.5	22	23.5	20	0.0574	0.0284
20	Macho	IP		29.2	28.5	28.5	29.5	27	0.0965	0.0297
21	Hembra	IP		18	18	20	20.5	20.5	0.1393	0.0672
22	Hembra	IP		21.6	21	22	21	21	0.1273	0.0655
23	Hembra	IP		16.5	15.5	17	19.5	19	0.1065	0.0964

INDIVIDUO	Fenoles Bazo (EAG µg/mg albúmina)	Fenoles Timo (EAG µg/mg albúmina)	Fenoles Sangre (EAG µg/mg albúmina)	HP Bazo (absorbancia/mg albúmina)	LP Bazo (absorbancia/mg albúmina)	HP Timo (absorbancia/mg albúmina)	LP Timo (absorbancia/mg albúmina)	HP Sangre (absorbancia/mg albúmina)	LP Sangre (absorbancia/mg albúmina)
1	1.81	0.31	20.52	0.0015	0.0011	0.0007	0.0022	0.042	0.05
2	1.76	0.14	28.48	0.0011	0.0009	0.0007	0.0018	0.02	0.026
3	2.43	0.44	22.09	0.0009	0	0.0018	0.0029	0.068	0.055
4	2.38	0.36	51.92	0.002	0.0024	0.0009	0.001	0.017	0.043
5	2.69	0.39	44.44	0.0016	0.0022	0.0006	0.0017	0.017	0.034
6	2.10	0.33	43.03	0.0017	0.0015	0.0011	0.0025	0.02	0.03
7	1.59	0.22	s/d	0.0014	0.0028	0.0006	0.0034	0.011	0.016
8	0.49	0.31	46.94	0.0005	0.0014	0.0006	0.0024	0.018	0.023
9	0.93	0.41	33.94	0.0013	0.0003	0.0006	0.001	0.018	0.019
10	1.98	0.3	38.33	0.0006	0.0018	0.0004	0.002	0.031	0.039
11	1.50	s/d	45.36	0.0008	0.003	0.0013	0.0026	0.038	0.043
12	2.69	0.32	32.65	0.0009	0.0035	0.0005	0.0032	0.033	0.043
13	1.47	0.36	44.09	0.0014	0.0009	0.0013	0.003	0.021	0.039
14	1.41	0.27	31.37	0.0012	0.0002	0.0006	0.0017	0.021	0.056
15	1.90	0.47	19.56	0.0012	0.0007	0.0008	0.0017	0.022	0.026
16	2.21	0.71	11.09	0.0007	0.0015	0.0015	0.004	0.023	0.03
17	2.47	0.33	s/d	0.0008	0.0015	0.0006	0.0011	0.028	0.034
18	0.66	s/d	s/d	0.0007	0.0014	0.0006	0.003	0.025	0.027
19	1.23	0.17	46.27	0.0005	0.001	0.0003	0.0027	0.023	0.036
20	1.81	0.17	26.31	0.0006	0.0005	0.0005	0.0011	0.027	0.022
21	1.93	0.65	46.71	0.0014	0.0028	0.0013	0.0033	0.035	0.039
22	1.67	0.61	26.08	0.0016	0.002	0.0014	0.0031	0.036	0.064
23	0.86	0.77	s/d	0.001	0.0017	0.0017	0.0039	0.034	0.048

INDIVIDUO	Nitritos Bazo (uM/mg albúmina)	Nitritos Timo (uM/mg albúmina)	SO Bazo (absorbancia/mg albúmina)	SO Timo (absorbancia/mg albúmina)	SO Sangre (absorbancia/mg albúmina)
1	135.47	6.97	1.12	0.18	9.26
2	95.52	5.99	0.88	0.15	8.69
3	92.57	8.59	1.09	0.33	7.32
4	133.80	9.77	1.12	0.45	18.40
5	113.74	8.8	0.81	0.26	20.04
6	101.45	9.34	0.73	0.47	15.40
7	140.78	5.24	1.01	0.31	18.43
8	69.55	7.39	0.94	0.26	13.94
9	118.55	8.94	0.92	0.33	6.89
10	83.66	7.32	1.06	0.27	12.89
11	80.28	8.49	0.79	0.60	18.91
12	127.28	6.9	1.19	0.49	13.26
13	113.31	14.47	1.21	s/d	12.01
14	70.76	13.23	0.88	0.33	34.84
15	86.77	7.29	0.96	0.39	19.98
16	76.31	13.04	0.98	0.58	18.46
17	127.65	9.94	1.39	0.41	15.96
18	65.87	7.7	0.67	0.74	17.89
19	18.29	5.2	0.47	0.11	10.15
20	167.66	2.97	0.94	0.26	13.76
21	109.73	7.16	0.89	0.51	15.10
22	114.20	7.42	1.20	0.47	17.30
23	61.53	s/d	0.78	0.44	s/d

ANEXO 3: Modelo Experimental N°2

GRUPO EXPERIMENTAL	INDIVIDUO	TRATAMIENTO	Arsénico	IP	AQB	Viabilidad (absorbancia/célula)
CONTROL	1	0 + 0 As	0	0	0	0.0000444
	2	0 + 0 As	0	0	0	s/d
	3	0 + 0 As	0	0	0	0.0000591
	4	0 + 0 As	0	0	0	0.0000207
	5	0 + 0 As	0	0	0	0.0000415
	6	0 + 0 As	0	0	0	0.0000412
ARSÉNICO	7	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000188
	8	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000235
	9	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000124
	10	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000262
	11	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000214
	12	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000276
	13	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000335
	14	0 + DL50 As	19	0	0	0.0000233
AQB	15	50 AQB + 0 As (3hs)	0	0	50	0.0000182
	16	50 AQB + 0 As (3hs)	0	0	50	0.0000120
	17	50 AQB + 0 As (3hs)	0	0	50	0.0000132
AQB + As	18	50 AQB + DL50 As (3hs)	19	0	50	0.0000443
	19	50 AQB + DL50 As (3hs)	19	0	50	s/d
	20	50 AQB + DL50 As (3hs)	19	0	50	0.0000116
	21	50 AQB + DL50 As (3hs)	19	0	50	0.0000153
	22	50 AQB + DL50 As (3hs)	19	0	50	0.0000240
IP	23	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000380
	24	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000334
	25	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000426
	26	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000315
	27	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000269
	28	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000361
	29	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000445
	30	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000399
	31	50 IP + 0 As (3hs)	0	50	0	0.0000491
IP + As	32	50 IP + DL50 As (3hs)	19	50	0	0.0000420
	33	50 IP + DL50 As (3hs)	19	50	0	0.0000352
	34	50 IP + DL50 As (3hs)	19	50	0	0.0000206
	35	50 IP + DL50 As (3hs)	19	50	0	0.0000284
	36	50 IP + DL50 As (3hs)	19	50	0	0.0000242

INDIVIDUO	INDIVIDUO	TRATAMIENTO	Fenoles Bazo (EAG µg/mg albúmina)	Fenoles Timo (EAG µg/mg albúmina)	Fenoles Sangre (EAG µg/mg albúmina)
CONTROL	1	0 + 0 As	s/d	0.000419	s/d
	2	0 + 0 As	s/d	0.000076	s/d
	3	0 + 0 As	s/d	0.000145	s/d
	4	0 + 0 As	0.000621	s/d	0.000038
	5	0 + 0 As	0.000429	0.000175	0.000042
	6	0 + 0 As	0.000728	0.000402	0.000039
ARSÉNICO	7	0 + DL50 As	0.000473	s/d	s/d
	8	0 + DL50 As	0.000543	0.000081	s/d
	9	0 + DL50 As	0.000132	0.000118	s/d
	10	0 + DL50 As	0.000539	s/d	0.000042
	11	0 + DL50 As	s/d	0.000029	s/d
	12	0 + DL50 As	0.000241	s/d	0.000050
	13	0 + DL50 As	0.000291	0.000018	s/d
	14	0 + DL50 As	0.000121	s/d	s/d
IP	15	50 IP + 0 As (3hs)	0.000860	0.000266	0.000034
	16	50 IP + 0 As (3hs)	0.000710	0.000215	0.000032
	17	50 IP + 0 As (3hs)	0.001010	0.000317	0.000035
	18	50 IP + 0 As (3hs)	0.000700	0.000166	0.000030
	19	50 IP + 0 As (3hs)	0.000550	0.000115	0.000028
	20	50 IP + 0 As (3hs)	0.000850	0.000217	0.000032
	21	50 IP + 0 As (3hs)	0.001020	0.000366	0.000037
	22	50 IP + 0 As (3hs)	0.000870	0.000315	0.000035
	23	50 IP + 0 As (3hs)	0.001170	0.000417	0.000039
IP + As	24	50 IP + DL50 As (3hs)	0.000404	s/d	0.000040
	25	50 IP + DL50 As (3hs)	s/d	s/d	0.000039
	26	50 IP + DL50 As (3hs)	0.000209	0.000106	s/d
	27	50 IP + DL50 As (3hs)	0.001102	0.000068	s/d
	28	50 IP + DL50 As (3hs)	0.000705	s/d	s/d

INDIVIDUO	INDIVIDUO	HP Bazo (absorbancia/mg albúmina)	HP Timo (absorbancia/mg albúmina)	HP Sangre (absorbancia/mg albúmina)	LP Bazo (absorbancia/mg albúmina)	LP Timo (absorbancia/mg albúmina)	LP Sangre (absorbancia/mg albúmina)
CONTROL	1	s/d	0.0106	s/d	s/d	0.0162	s/d
	2	s/d	0.0155	s/d	s/d	0.0041	s/d
	3	s/d	0.0141	s/d	s/d	0.0062	s/d
	4	0.0112	0.0187	0.0056	0.0074	0.0039	0.0038
	5	0.0113	0.0132	0.0055	0.0093	0.0087	0.0032
	6	0.0224	0.0158	0.0055	0.0139	s/d	0.0074
ARSÉNICO	7	0.0144	0.0220	s/d	0.0051	0.0084	s/d
	8	0.0077	0.0155	s/d	0.0056	0.0127	s/d
	9	0.0042	0.0161	s/d	0.0046	0.0139	s/d
	10	0.0066	0.0115	0.0037	0.0082	0.0141	0.0047
	11	0.0110	0.0097	0.0032	0.0068	0.0067	0.0040
	12	0.0055	s/d	0.0048	0.0023	s/d	0.0055
	13	0.0224	0.0213	s/d	0.0145	0.0397	s/d
	14	0.0323	s/d	s/d	0.0182	s/d	s/d
IP	15	0.0435	0.0125	0.0125	0.0250	0.0285	0.0047
	16	0.0335	0.0109	0.0121	0.0207	0.0244	0.0036
	17	0.0535	0.0141	0.0128	0.0293	0.0326	0.0058
	18	0.0360	0.0092	0.0120	0.0205	0.0220	0.0030
	19	0.0260	0.0076	0.0117	0.0162	0.0179	0.0019
	20	0.0460	0.0108	0.0123	0.0248	0.0261	0.0041
	21	0.0510	0.0157	0.0129	0.0296	0.0350	0.0064
	22	0.0410	0.0141	0.0126	0.0253	0.0309	0.0053
	23	0.0610	0.0173	0.0132	0.0339	0.0391	0.0075
IP + As	24	0.0309	s/d	0.0065	0.0171	s/d	0.0028
	25	s/d	s/d	0.0061	s/d	s/d	0.0064
	26	0.0439	0.0208	s/d	0.0217	0.0293	s/d
	27	s/d	0.0161	s/d	0.0409	0.0313	s/d
	28	0.0645	s/d	s/d	0.0139	0.0434	s/d

INDIVIDUO	INDIVIDUO	SH Bazo (mg N-acetil/ mg de proteína)	SH Timo (mg N-acetil/ mg de proteína)	SH Sangre (mg N-acetil/ mg de proteína)	PAOP Bazo (mg Cloramina T/mg de albúmina)	PAOP Bazo (mg Cloramina T/mg de albúmina)
CONTROL	1	s/d	0.0100	s/d	s/d	0.0746
	2	s/d	0.0129	s/d	s/d	0.0545
	3	s/d	0.0126	s/d	s/d	s/d
	4	0.0147	0.0150	0.0154	0.0354	s/d
	5	0.0121	0.0233	0.0151	0.0548	0.0782
	6	0.0159	0.0188	0.0186	0.0861	0.0805
ARSÉNICO	7	0.0115	0.0720	s/d	0.0731	0.0440
	8	0.0040	0.0198	s/d	0.0324	0.0957
	9	0.0037	0.0324	s/d	0.0214	0.0301
	10	0.0078	0.0122	0.0165	0.0265	0.0625
	11	0.0099	0.0099	0.0177	0.0214	0.0369
	12	0.0065	s/d	0.0168	0.0521	s/d
	13	s/d	0.0458	s/d	0.0835	0.1169
	14	s/d	0.0641	s/d	0.1076	s/d
IP	15	0.0360	0.0203	0.0193	0.1550	0.1060
	16	0.0311	0.0103	0.0185	0.1250	0.0860
	17	0.0409	0.0303	0.0200	0.1850	0.1260
	18	0.0305	0.0058	0.0181	0.1240	0.0825
	19	0.0256	s/d	0.0173	0.0940	0.0625
	20	0.0354	0.0158	0.0188	0.1540	0.1025
	21	0.0415	0.0348	0.0205	0.1860	0.1295
	22	0.0366	0.0248	0.0197	0.1560	0.1095
	23	0.0464	0.0448	0.0212	0.2160	0.1495
IP + As	24	0.0144	s/d	0.0163	0.0404	0.1532
	25	s/d	s/d	0.0161	s/d	s/d
	26	0.0291	0.0379	s/d	0.1210	0.0833
	27	0.0465	0.0359	s/d	0.2333	0.0648
	28	0.0434	s/d	s/d	0.1973	s/d

INDIVIDUO	INDIVIDUO	HIERRO Bazo (µg de hierro/mg de proteína)	HIERRO Timo (µg de hierro/mg de proteína)
CONTROL	1	s/d	s/d
	2	s/d	s/d
	3	s/d	s/d
	4	0.2103	0.0751
	5	0.1151	0.0434
	6	0.1245	0.1376
ARSÉNICO	7	s/d	s/d
	8	s/d	s/d
	9	s/d	s/d
	10	0.0529	0.0323
	11	0.1244	s/d
	12	0.0728	s/d
	13	0.0892	0.0669
	14	0.0888	0.0855
IP	15	0.2600	0.0790
	16	0.2400	0.0590
	17	0.2800	0.0990
	18	0.2290	0.0525
	19	0.2090	0.0325
	20	0.2490	0.0725
	21	0.2910	0.1055
	22	0.2710	0.0855
	23	0.3110	0.1255
IP + As	24	s/d	s/d
	25	s/d	s/d
	26	0.1325	0.0464
	27	0.2318	0.0416
	28	0.2213	0.0635

INDIVIDUO	INDIVIDUO	Glucosa Esplenocitos (ug/célula)	Lactato Esplenocitos (ug/célula)	Grupos SH Esplenocitos (ug/célula)	Superóxido Esplenocitos (absorbancia/célula)
CONTROL	1	0.000387	0.000115	0.000028	0.000368
	2	s/d	0.000220	0.000039	s/d
	3	0.000540	0.000219	0.000018	0.000282
	4	0.000452	0.000115	0.000025	0.000296
	5	0.000535	0.000144	0.000018	0.000388
	6	0.000370	0.000098	0.000053	0.000365
ARSÉNICO	7	s/d	s/d	s/d	s/d
	8	0.000550	0.000133	0.000020	0.000499
	9	0.000164	0.000041	0.000012	0.000186
	10	0.000190	0.000059	0.000017	0.000228
	11	0.000210	0.000075	0.000012	0.000195
	12	s/d	s/d	s/d	s/d
	13	0.000638	0.000197	s/d	0.000620
	14	0.000458	0.000093	s/d	0.000467
IP	15	0.000875	0.000107	0.000064	0.000495
	16	0.000795	0.000086	0.000059	0.000432
	17	0.000955	0.000128	0.000069	0.000558
	18	0.000760	0.000071	0.000055	0.000395
	19	0.000680	0.000050	0.000049	0.000332
	20	0.000840	0.000092	0.000060	0.000458
	21	0.000990	0.000143	0.000074	0.000595
	22	0.000910	0.000122	0.000068	0.000532
	23	0.001070	0.000164	0.000079	0.000658
IP + As	24	0.000493	0.000064	0.000069	0.000374
	25	0.001013	s/d	s/d	s/d
	26	0.000735	0.000052	0.000043	0.000543
	27	0.000890	0.000053	0.000036	0.000649
	28	s/d	s/d	s/d	s/d