

Disección de los mecanismos de acción neuroprotectora de la yerba mate sobre las neuronas nigroestriatales en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson

Taravini, Irene R.; Cura, Andrea C.; Tribbia, Liliana T.; Echeverria, Florencia

Autoras/es: Laboratorio de Neurobiología Experimental. Facultad de Bromatología. Universidad Nacional de Entre Ríos. (2820) Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.

Contacto: irene.taravini@uner.edu.ar

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/8nj3mys8p>

Resumen

Las causas precisas que desencadenan la muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson (EP) no se han esclarecido. Por ello, surge el desafío de hallar agentes con acción protectora con el fin último de reducir los síntomas, retrasar o incluso prevenir la expresión de esta enfermedad. Numerosos trabajos muestran que el consumo de café y/o tabaco se asocia con una menor aparición de la EP a nivel poblacional y también se ha reportado un efecto similar asociado al consumo de mate. Recientemente, hemos observado que la administración a largo plazo de yerba mate (YM) tiene un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas en ratones hemiparkinsonianos. Proponemos estudiar los mecanismos bioquímico-moleculares y estructurales que subyacen al efecto neuroprotector de la YM sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de la EP. Esperamos que los resultados de este trabajo refuercen los conocimientos sobre el modo de acción de la YM, permitan revalorizar su consumo y redefinir su utilización resaltando sus propiedades benéficas para la salud. Además, esperamos que contribuyan al desarrollo de novedosas intervenciones terapéuticas, utilizando la YM para prevenir o retrasar la expresión de la EP o como alternativa para su tratamiento en asociación con los fármacos antiparkinsonianos frecuentemente utilizados.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, yerba Mate, neuroprotección

Objetivo general

La muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) conlleva a la aparición de la EP. Dado que las causas precisas que desencadenan esta muerte neuronal no se han esclarecido, surge el desafío de hallar agentes con acción protectora con el fin último de reducir los síntomas, retrasar o incluso prevenir la expresión de esta enfermedad. Numerosos trabajos muestran que el consumo de café y/o tabaco se asocia con una menor aparición de la EP a nivel poblacional y también se ha reportado un efecto similar asociado al consumo de mate. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos observado que la administración a largo plazo de YM tiene un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas en ratones hemiparkinsonianos. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la importancia del consumo de mate en nuestra región, este proyecto tiene como objetivo general estudiar los mecanismos bioquímico-moleculares que subyacen al efecto neuroprotector de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo en ratón de la EP.

Objetivo específico cumplido

Evaluar si el efecto neuroprotector que presenta la YM *in vivo* se correlaciona con un efecto antioxidante a nivel del sistema nigroestriatal, analizando biomarcadores de estrés oxidativo en el núcleo estriado y la SNpc de animales hemiparkinsonianos.

Objetivo específico no cumplido*

Analizar los efectos del tratamiento crónico con YM sobre marcadores de indemnidad neuronal, la morfología del soma y de las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas que sobreviven luego de la lesión con 6-OHDA, mediante la medición de los niveles de biomarcadores neuronales y la evaluación de la morfometría del soma neuronal y la arborización dendrítica y axonal.

* Por pandemia COVID-19

Marco teórico

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa luego de la enfermedad de Alzheimer, con un amplio rango de prevalencia de acuerdo con las poblaciones examinadas, estimándose en el 1% en individuos mayores de 60 años y pudiendo alcanzar una prevalencia del 4% en pacientes mayores de 80 años.¹ El proceso neurodegenerativo afecta primordialmente a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc provocando una depleción del contenido de dopamina en el núcleo estriado.² Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la EP no han sido totalmente esclarecidos y actualmente no existen terapias preventivas para esta enfermedad. Estudios epidemiológicos indican que más allá de un determinismo genético existe una interacción crónica y compleja entre factores genéticos, neurotoxinas y agentes medioambientales que contribuirían a la expresión de la enfermedad.³ Más aún, numerosos factores ambientales, como traumatismos craneoencefálicos previos y la exposición a pesticidas, han sido considerados como posibles factores causales o de riesgo para la EP.^{4,5} Por otro lado, se ha reportado la existencia de una relación inversa entre el consumo de tabaco y/o café y la expresión de la EP.^{4,6}

Las causas que inducen la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas aún son desconocidas, aunque hay evidencia de que factores como la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial podrían desempeñar un papel clave.^{7,8} Incluso, se ha sugerido que el daño oxidativo del ADN mitocondrial está relacionado con el desarrollo de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.⁹ Además, la utilización de antioxidantes como agentes neuroprotectores pueden mejorar el pronóstico de la EP.^{10,11} La disrupción del balance fisiológico del potencial redox en las neuronas interfiere con varios procesos biológicos, lo que finalmente conduce a la muerte celular. Se ha probado ampliamente que el daño oxidativo y nitrativo de los componentes celulares son clave en el proceso de degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc proporcionando valiosas pistas sobre los mecanismos de la enfermedad.^{8,12}

Se reconocen varias fuentes y mecanismos para la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés: *reactive oxygen species*), incluido el metabolismo de la dopamina en sí, la disfunción mitocondrial, el hierro, la neuroinflamación, un desbalance en el metabolismo del calcio y el envejecimiento.¹²⁻¹⁵ Es evidente que la interacción entre estos múltiples mecanismos contribuye a la neurodegeneración en la EP, planteándose un escenario de retroalimentación donde la injuria primaria conduce a un estado de estrés oxidativo, que daña proteínas celulares, las que a su vez causan mayor producción de ROS.

El consumo de yerba mate (YM) en sus distintas variantes, especialmente como “mate”, es ampliamente popular en los países del Río de la Plata. Se ha demostrado que proporciona numerosos beneficios para la Salud,¹⁶⁻¹⁹ los que se relacionan fuertemente con la gran variedad de fitoquímicos bioactivos que componen la YM. Entre ellos, los compuestos mayoritarios son polifenoles (ácido clorogénico) y xantinas (cafeína y teobromina), seguido por alcaloides de la purina (ácido cafeico, ácido 3, 4-dicafeoilquinico, ácido 3, 5-dicafeoilquinico) y flavonoides (quercetina, kaempferol y rutina).²⁰ En la última década, se ha reportado que la YM tiene efectos beneficiosos sobre el sistema nervioso central, incluyendo propiedades anticonvulsivantes, antidepresivas, ansiolíticas y mejoras en el aprendizaje y la memoria.²¹⁻²⁴ En el contexto de la EP, estudios recientes sugieren que en humanos existe una relación inversa entre el consumo de mate y el riesgo de desarrollar la enfermedad;²⁵ y en ratones, un extracto hidroalcohólico de YM podría tener un efecto antiparkinsoniano, posiblemente mediante un mecanismo antioxidante.²⁶ La YM presenta una alta actividad antioxidante, relacionada con la concentración de ácidos cafeoilquínicos,²⁷⁻²⁹ lo que le permite neutralizar ROS de manera similar a la actividad peroxidasa. Además, la YM modula positivamente la actividad antioxidante enzimática, neutraliza radicales libres²⁸⁻³¹ y tiene actividad inhibidora sobre la nitración de proteínas, un proceso implicado en la fisiopatología de la EP.^{27,32}

Aún no existen estudios concluyentes que demuestren si los compuestos bioactivos de la YM proporcionan un alivio sintomático en la EP o tienen un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas. Recientemente, hemos observado que ratones tratados durante cuatro meses con YM, después de una lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), presentan una densidad de fibras dopaminérgicas remanentes en el estriado mayor que aquellos ratones tratados con agua. Las actividades aquí propuestas buscan esclarecer si las propiedades antioxidantes que posee la YM se relacionan con su efecto protector de las neuronas dopaminérgicas que degeneran en la EP.

Marco metodológico

1. Protocolo de obtención del extracto de YM y administración a los animales

Ratones C57BL/6 se dividieron al azar para recibir una infusión de YM (MATE) o agua (AGUA). Se preparó la infusión siguiendo la forma de preparación del “mate bombilla”, forma en que se consume tradicionalmente la YM. Se utilizó YM (*Ilex paraguariensis Saint Hilaire*) disponible comercialmente, siempre conservando la misma marca y lote durante todo el experimento. Se colocó la YM en un recipiente con una bombilla de metal y se cebó el mate agregando alícuotas sucesivas de agua caliente. Conectando la bombilla a un sistema de vacío, se recolectó el líquido simulando una cebada (“mateada o cebada simulada”).^{33,34} Un grupo de animales (MATE, n=12) tuvo acceso a la infusión y diluida al medio en el biberón habitual protegido de la luz para evitar la fotooxidación de la infusión; siendo la única fuente de líquido disponible para los animales. Esta se preparó 3 veces a la semana y se administró durante 4 meses antes de la lesión 6-OHDA. Un grupo de animales control recibió agua corriente en el mismo tipo de biberón durante todo el tratamiento (AGUA, n=12).

Luego, los animales de ambos grupos fueron divididos aleatoriamente, conformándose los siguientes sets experimentales:

- Grupo 2D: AGUA2D (n=6) y MATE2D (n=6) que continuaron con el tratamiento asignado 2 días luego de la lesión.
- Grupo 30D: AGUA30D (n=6) y MATE30D (n=6) que continuaron con el tratamiento asignado 30 días luego de la lesión.

Otro grupo independiente de animales fue tratado como se describe previamente, AGUA (n=8) y MATE (n=7) y todos fueron sacrificados por perfusión intracardiaca con paraformaldehído 4% a los 30 días luego de la lesión con 6-OHDA.

2. Caracterización de compuestos bioactivos presentes en el extracto acuoso de YM y determinación de su estabilidad mediante HPLC.

En los extractos obtenidos por “cebada simulada” se determinó la presencia y estabilidad de los principales compuestos bioactivos de la YM mediante HPLC (cromatógrafo HPLC Waters Binario Modelo 1525 con detector de arreglo de diodos Waters Modelo 2996). Se determinó la concentración de teobromina, ácido clorogénico, cafeína y rutina en muestras del extracto obtenido por “cebada simulada” y el mismo extracto diluido al medio, que fue el que se utilizó en el protocolo de administración a los animales. La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de tiempos de retención y espectros de absorción, y co-inyección de estándares. La cuantificación de estos compuestos se realizó mediante la técnica de estándar externo. Para evaluar la estabilidad de estos compuestos en ambos extractos (el obtenido directamente por cebada simulada y el diluido al medio) se procedió a analizar las concentraciones de los compuestos mencionados anteriormente, el día que se preparó la infusión (inicial), a las 24 y a las 48 hs posteriores a la preparación.

3. Lesión mediante la inyección estereotáxica unilateral de 6-OHDA en el núcleo estriado.

Luego de 4 meses de tratamiento todos los animales, bajo anestesia inhalatoria (isoflurano) se inyectaron con 6-OHDA 2 µg/µl, en dos sitios (2,5 µg totales) del estriado

de manera unilateral. Las coordenadas de inyección en el hemisferio izquierdo (en mm respecto del bregma) fueron: Sitio 1 (1,5 µg/0,75 µl): AP: +0,13; ML: +0,20; DV: -0,29. Sitio 2 (1 µg/0,5 µl): AP: +0,04; ML: +0,23; DV: -0,29.³⁵

4. Evaluación conductual: Prueba locomotora en un campo abierto (open field).

La actividad exploratoria general se evaluó mediante el test conductual de campo abierto previo a la lesión (a los 60 y 120 días de tratamiento) para todos los animales y a los 15 y 30 días poslesión para los animales del grupo 30D. Esta prueba de *campo abierto* se realiza en un área encerrada en una pared que tiene la altura suficiente para evitar que el animal escape. Las formas típicas de la arena son circulares o cuadradas con un área lo suficientemente grande, según el tamaño del animal examinado, para provocar una sensación de apertura en el centro del campo.³⁶ Se colocó cada animal en una caja de 40x40 cm (x 25 cm de alto) y se permitió que explore libremente la misma durante 10 minutos. Se filmó cada sesión de prueba y luego se analizó, con una versión *off line* del programa ANY-maze (www.anymaze.co.uk), la distancia total recorrida (cm) y la velocidad promedio (cm/s).

5. Evaluación conductual: Prueba del cilindro.

Esta es una prueba comportamental no farmacológica en la que se evalúa la funcionalidad del sistema nigroestriatal mediante el análisis de la asimetría en el uso de las patas delanteras.^{37,38} Se realizó esta prueba antes de la lesión para todos los animales y luego a los 2 días poslesión para los animales 2D y a los 15 y 30 días poslesión para los animales 30D. Esta prueba evalúa la conducta espontánea del animal sin intervención del investigador durante la misma. Para ello, el animal se coloca en un cilindro de acrílico (10 cm de diámetro y 15 cm de alto), e inicia la actividad exploratoria del nuevo ambiente durante tres minutos. Una de las formas de exploración que presenta el animal es la exploración vertical, elevándose sobre sus patas traseras y apoyando las delanteras sobre la pared del cilindro. Se contabilizó el número total de veces que el animal apoya primero cada una de las patas (derecha o izquierda) o ambas juntas.

6. Determinación de compuestos bioactivos en el plasma de ratones tratados con YM mediante HPLC.

Para ambos sub-set experimentales, una vez completado el protocolo (2 días y 30 días poslesión), los animales fueron anestesiados con isoflurano y se procedió a la extracción de sangre por vena cava inferior. Esto se realiza previo a la disección del cerebro para ser utilizados en la determinación de capacidad antioxidante (ver abajo punto 7). Como el volumen de plasma obtenido de cada animal fue muy pequeño y está por debajo del volumen mínimo que requiere el autoinyector del equipo de HPLC, se realizaron 3 pools de plasma de animales que tomaron MATE y 3 pools de plasma de animales que tomaron AGUA para cada tiempo experimental, disponiéndose el plasma de 2 animales por pool para cada grupo. Cada pool se analizó por triplicado determinándose la presencia de los compuestos bioactivos de la YM teobromina, ácido clorogénico, cafeína y rutina por HPLC (como se describió previamente, punto 2).

7. Determinación de la capacidad antioxidante de homogenatos de mesencéfalo ventral y estriado mediante el ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ensayo del ABTS.

Luego del sacrificio (2 y 30 días poslesión) se disecó el cerebro de los animales bajo tratamiento. Se realizó un homogenato del tejido correspondiente al mesencéfalo ventral (SNpc) y al estriado del hemisferio lesionado para cada animal a fin de realizar la determinación de la capacidad antioxidante del tejido mediante la prueba TEAC.³⁹ La capacidad de captación de radicales libres de la muestra de tejido, calculada como inhibición porcentual de catión radical ABTS, se comparó con una curva estándar de Trolox. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox por gramo de peso de tejido húmedo, es decir, la cantidad de Trolox (μmol) con un potencial antioxidante equivalente a 1 g del tejido bajo investigación.

8. Obtención del tejido fijado para inmunohistoquímica.

Al final del tratamiento, los animales correspondiente a la segunda tanda de tratamiento (AGUA $n=8$, MATE $n=7$) profundamente anestesiados como se describió previamente fueron perfundidos transcárdiacamente con paraformaldehído 4%. Los cerebros fueron disecados, postfijados y crioprotegidos para luego obtener secciones coronales seriadas a nivel del estriado de 30 μm de espesor.

9. Inmunohistoquímica para TH y GFAP en el núcleo estriado.

Las secciones de tejido fijado se utilizaron para realizar la detección inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), y *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP). Luego de la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios unidos a biotina, la presencia del complejo antígeno-anticuerpo se visualizó por medio de un complejo avidina-biotina peroxidasa, desarrollado con 3,3'-diaminobencidina tetraclorhidrato.

La integridad del sistema dopaminérgico a nivel del estriado se evaluó mediante la determinación de la DO de secciones inmunomarcadas para TH. Empleando las herramientas del programa de procesamiento y análisis de imágenes Image J (<http://rsb.info.nih.gov>). Se tomaron microfotografías de 6 niveles rostrocaudales del estriado empleando una en escala de grises con una profundidad de 8 bits. El valor umbral de densidad óptica se estableció de manera que permitió diferenciar la señal específica de la inespecífica. Este valor umbral se determinó en el hemisferio control para cada nivel y se utilizó para medir el porcentaje de área inmunoreactiva en el estriado inyectado respectivo.⁴⁰

Para analizar el nivel de inmunomarcación con GFAP se cuantificó la densidad óptica sobre microfotografías de secciones estriatales inmunomarcadas. Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ y se calculó el valor medio de densidad óptica integrada a partir de la selección de áreas de interés de 200 μm^2 en las regiones dorsolateral, ventrolateral, dorsomedial y ventromedial para cuatro niveles rostrocaudales del estriado.

10. Esquema general de los protocolos experimentales.

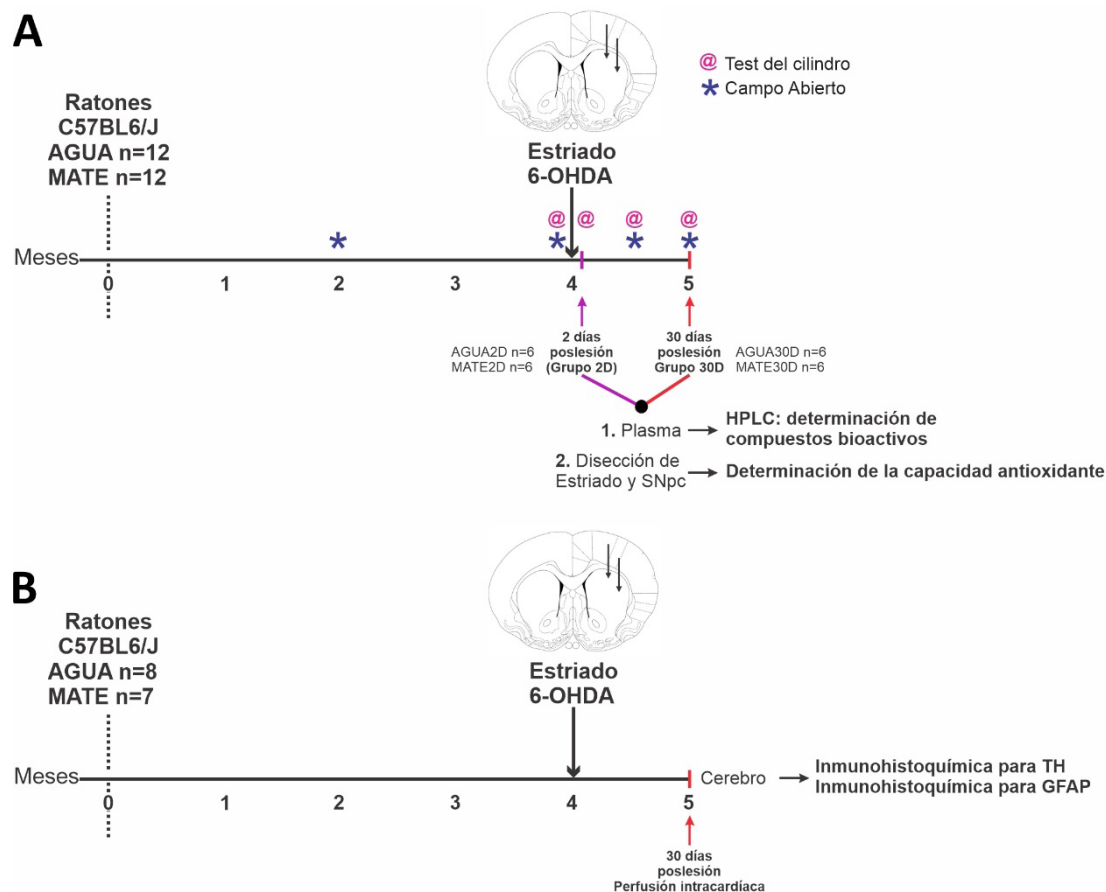


Figura 1: Línea temporal de los experimentos con YM. **A.** Los animales tomaron agua (AGUA, n=12) y otros tomaron la infusión de YM (MATE, n=12) por 4 meses antes de la lesión con 6-OHDA. Se realizó la evaluación de la conducta en un campo abierto (*). Luego de la lesión un grupo de AGUA y otro de MATE se sacrificaron a los 2 días (AGUA2D, n=6 y MATE2D n=6) inmediatamente después de realizarles la prueba del cilindro (@). El resto de los animales continuaron con sus tratamientos, se les realizó la prueba del cilindro (@) y la evaluación de la conducta en un campo abierto (*) a los 15 y 30 días, y fueron sacrificados 1 mes posesión (AGUA30D, n=6 y MATE30D n=6). Para todos los grupos, se extrajo sangre para obtención de plasma y posterior análisis de compuestos bioactivos mediante HPLC y se disecó el estriado y el mesencéfalo ventral para determinación de capacidad antioxidante empleando la prueba ABTS. **B.** En otro set experimental independiente los animales fueron tratados por 4 meses con AGUA (n=8) o YM (n=7), luego fueron lesionados con 6-OHDA y al cabo de 30 días fueron sacrificados por perfusión intracardiaca. Sobre el tejido cerebral fijado se realizó la determinación inmunohistoquímica de TH y GFAP a nivel del núcleo estriado. Protocolo aprobado por el CICUAL-FB-UNER Exp-FBRO-UER-0000129/2019.

Resultados y discusión

1. Protocolo de obtención del extracto de YM y administración a los animales

La preparación de la infusión de *mate* por “cebada simulada” es un procedimiento sencillo que ha sido desarrollado siguiendo indicaciones del Dr. Luis Brumovsky.^{33,34} El peso de YM y los volúmenes de cebado han sido puestos a punto particularmente en nuestro laboratorio, se han estandarizado y se utiliza el mismo procedimiento para todas las tandas experimentales (Figura 2).



Figura 2: Administración del extracto de YM a los animales. **A.** Dispositivo que simula el consumo de mate, preparándolo por “mateada o cebada simulada” mediante la utilización de un recipiente de vidrio, bombilla y un kitasato acoplado a un sistema de vacío. **B.** Jaula de ratones tomando la infusión de YM en el biberón habitual cubierto con papel aluminio para evitar la posible fotooxidación de la infusión.

2. Caracterización de compuestos bioactivos presentes en el extracto acuoso de YM y determinación de su estabilidad mediante HPLC.

Mediante HPLC se determinó la concentración de teobromina, ácido clorogénico, cafeína y rutina en muestras del extracto obtenido directamente por “cebada simulada” (MATEcs) y en el mismo extracto diluido al medio (MATE) (Figura 3). Los resultados de estas determinaciones muestran que los valores encontrados en ambos extractos, en cuanto a la concentración de cafeína, son similares a los reportados en la literatura,^{22,41} De Moraes Reis y col. (2014)²² en su trabajo administran una infusión de YM a ratas que ha sido preparada como mate cocido y ha reportado una concentración de cafeína equivalente a 673,5 ppm. En el caso de Brun y col. (2015)⁴¹ la infusión administrada a ratas, preparada como mate cocido, presentó una concentración de cafeína de 740 ppm y la ingesta diaria fue calculada entre 20 y 70 mg/kg/día. En nuestro trabajo hemos determinado que la infusión obtenida por cebada simulada (MATEcs) presentó una concentración media de cafeína de 768,34 ppm y la infusión diluida presentó 366,79 ppm. Teniendo en cuenta el promedio del peso de los ratones y el volumen de MATE consumido diariamente, la dosis media consumida fue de 55,02 mg/kg/día. Asimismo, para evaluar la estabilidad de estos extractos, se determinaron las concentraciones de los compuestos mencionados anteriormente, el día que se preparó la infusión (inicial), a las 24 y 48 hs posteriores a la preparación. Los resultados muestran que no se producen modificaciones significativas en la concentración de los cuatro compuestos determinados a las 24 ni a las 48 hs luego de preparada la infusión, cuando se compara con las concentración de los mismos en el extracto recién preparado.

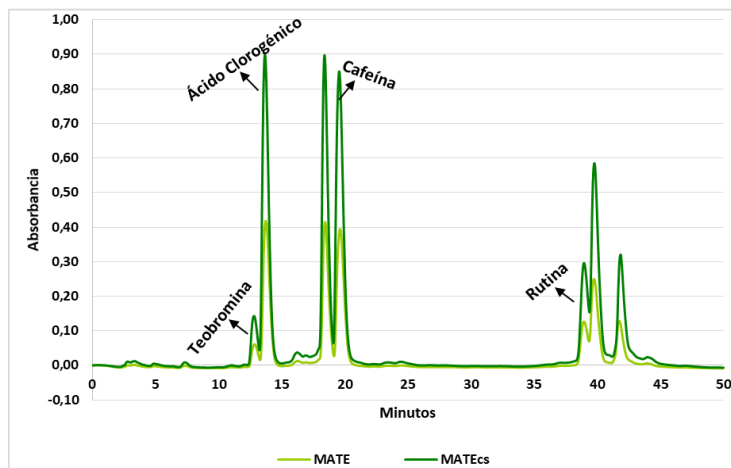


Figura 3: Caracterización de compuestos bioactivos presentes en el extracto acuoso de YM. Perfil cromatográfico de la muestra del extracto obtenido por cebada simulada (MATEcs, verde oscuro) y el extracto diluido al medio (MATE, verde claro) en los que se indican los picos de interés y el tiempo de retención de los cuatro compuestos determinados.

3. Lesión mediante la inyección estereotáxica unilateral de 6-OHDA en el núcleo estriado.

La inyección intraestriatal unilateral de 6-OHDA se usa comúnmente para generar un modelo de lesión parcial de la EP permitiendo estudiar los mecanismos moleculares involucrados en su patogénesis y también evaluar nuevos tratamientos neuroprotectores (Figura 4). La capacidad de la 6-OHDA para inducir neurodegeneración se ha relacionado con su capacidad para sufrir autooxidación en presencia de oxígeno y, en consecuencia, generar estrés oxidativo. Se ha reportado que los índices de peroxidación lipídica y de oxidación de proteínas aumentan simultáneamente en el cuerpo estriado y en el mesencéfalo ventral ipsilateral a la lesión, alcanzando un valor máximo a las 48 h después de la inyección.⁴² Estos datos sugieren que el estrés oxidativo es un posible factor desencadenante del proceso neurodegenerativo y la neurodegeneración retrógrada de los somas en la SNpc es consecuencia del daño celular causado durante los primeros días post inyección. Estos antecedentes fundamentan la importancia de evaluar los índices cerebrales de estrés oxidativo en este modelo 48 h después de la inyección de 6-OHDA. En consecuencia, diseñamos el protocolo experimental, siendo los grupos experimentales, los tratamientos y pruebas conductuales descritos en el esquema de la Figura 1.

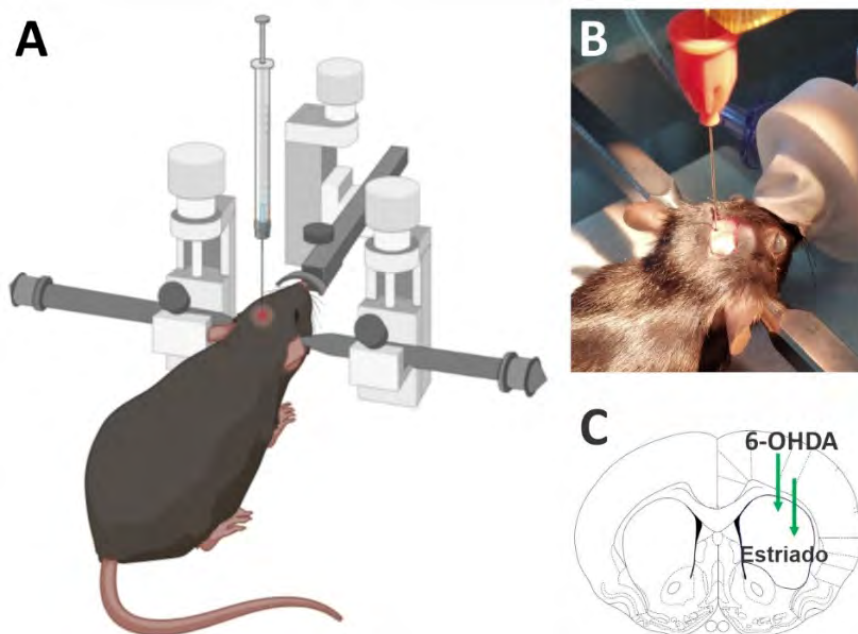


Figura 4: Inyección estereotáxica unilateral de 6-OHDA. **A.** Imagen gráfica de un ratón colocado en un marco estereotáxico para recibir la inyección intracerebral (intraestriatal) de 6-OHDA. **B.** Fotografía que muestra en mayor detalle la microinyección de la toxina. **C.** Plano del Atlas Paxinos³⁵ en el que se indica la zona de administración de 6-OHDA en el estriado dorsolateral.

4. Evaluación conductual: Prueba locomotora en un campo abierto (open field).

Esta prueba de *campo abierto* permite evaluar múltiples conductas del ratón en una caja o arena novedosa para el animal. Permite obtener una medida cuantitativa para evaluar la actividad locomotora general y exploratoria, particularmente el tipo de actividad en los primeros minutos de exploración; así como también los niveles de ansiedad en roedores y la habituación al ambiente. En la grabación de cada sesión de prueba por animal se analizó la distancia total recorrida (cm) y la velocidad promedio (cm/s) utilizando el programa Any-maze. Luego de procesar los datos para su análisis estadístico puede observarse que el reducido número de animales que componen cada grupo no permite arribar a resultados sólidos y estadísticamente analizables. No obstante, los valores obtenidos sugieren que, si bien los animales que reciben MATE exhiben una tendencia a moverse más que los que reciben AGUA tanto antes como después de la lesión, esta diferencia no es significativa independientemente del tiempo de tratamiento (Figura 5). Asimismo puede observarse que luego de la lesión los animales para ambos tratamientos exhiben una reducción tanto en la distancia total recorrida como en la velocidad promedio experimentada (Figura 5B, D).

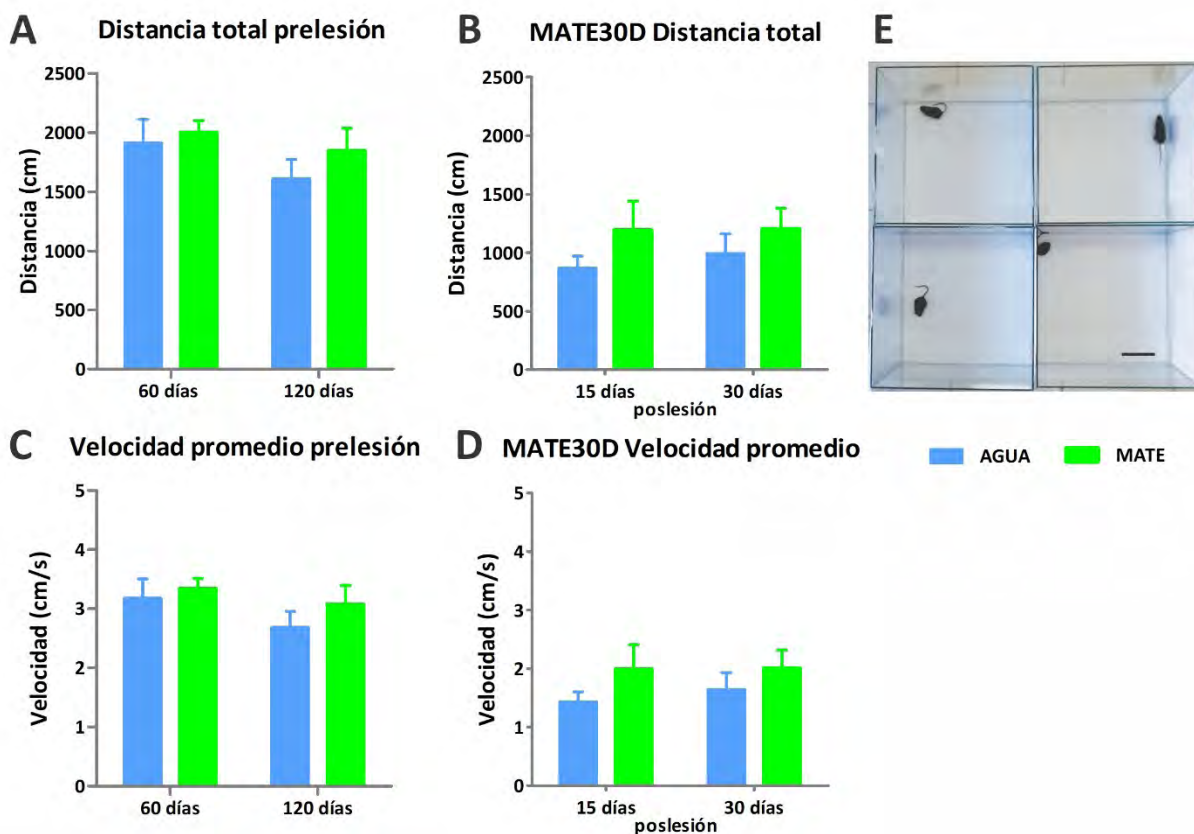


Figura 5: Evaluación de la conducta en un campo abierto. Distancia recorrida total (cm) durante los primeros 10 minutos dentro de la arena: **A.** previo a la lesión, 60 y 120 días de tratamiento (AGUA n=12, MATE n=12) y **B.** 15 y 30 días poslesión para el sub grupo de animales que recibieron sus respectivos tratamientos durante 30 días poslesión (AGUA n=6, MATE n=6). Velocidad promedio (cm/seg) en los primeros 10 minutos dentro de la arena: **C.** para todos los animales 60 y 120 días de tratamiento, previo a la lesión (AGUA n=12, MATE n=12) y **D.** 15 y 30 días poslesión para los animales del sub grupo sacrificado 30 días poslesión (AGUA n=6, MATE n=6). (media±EEM). **E.** Imagen que representa un momento de la filmación de la prueba de medición de la conducta en un campo abierto. Escala: 10 cm.

5. Evaluación conductual: Prueba del cilindro.

Una de las consecuencias de la lesión unilateral de la vía nigroestriada es la retracción de la extremidad delantera contralateral a la lesión, lo que se traduce en la falta de apoyo de la misma durante la exploración vertical, utilizando más frecuentemente la pata delantera ipsilateral a la lesión (Figura 6A1-2). El grado de afectación en el uso de la pata puede correlacionarse con el grado de desnervación dopaminérgica.

El análisis de los resultados muestra que no existen diferencias significativas (prueba t de Student) en la capacidad de utilización de la extremidad delantera contralateral previo a la lesión entre todos los animales que toman agua y los que toman YM (Figura 6B). Antes de la lesión con 6-OHDA los animales de ambos grupos (AGUA y MATE) fueron asignados aleatoriamente a los grupos 2D y 30D, según el tiempo de tratamiento poslesión. Para el grupo 2D, si bien puede observarse que luego de la lesión los animales de ambos grupos presentan una reducción significativa en el uso de la pata delantera contralateral a lesión, esta reducción es más pronunciada en los animales que recibieron AGUA en comparación con los que recibieron MATE (AGUA $p < 0,001$; MATE $p < 0,01$, ANOVA de dos vías para medidas repetidas). Esto lleva a pensar que el

tratamiento con YM induciría un beneficio terapéutico moderado en relación al uso de la pata luego de la lesión con 6-OHDA (Figura 6C). Para el caso del grupo 30D, solo los animales del grupo AGUA presentan una reducción estadísticamente significativa en el uso de la pata a los 15 días ($p < 0,05$) y 30 días ($p < 0,05$) poslesión (ANOVA de dos vías para medidas repetidas). Si bien los animales tratados con YM muestran cierto grado de compromiso en el uso de la pata luego de la lesión, los valores medios no difieren significativamente de los observados prelesión. Esto sugiere que la acción benéfica de la YM a nivel de las neuronas dopaminérgicas podría manifestarse a nivel conductual. Es importante considerar que el reducido número de animales por grupo ($n=6$ por grupo) resalta la necesidad de realizar una nueva tanda experimental y aumentar el tamaño muestral para dar solidez a la interpretación biológica de los resultados.

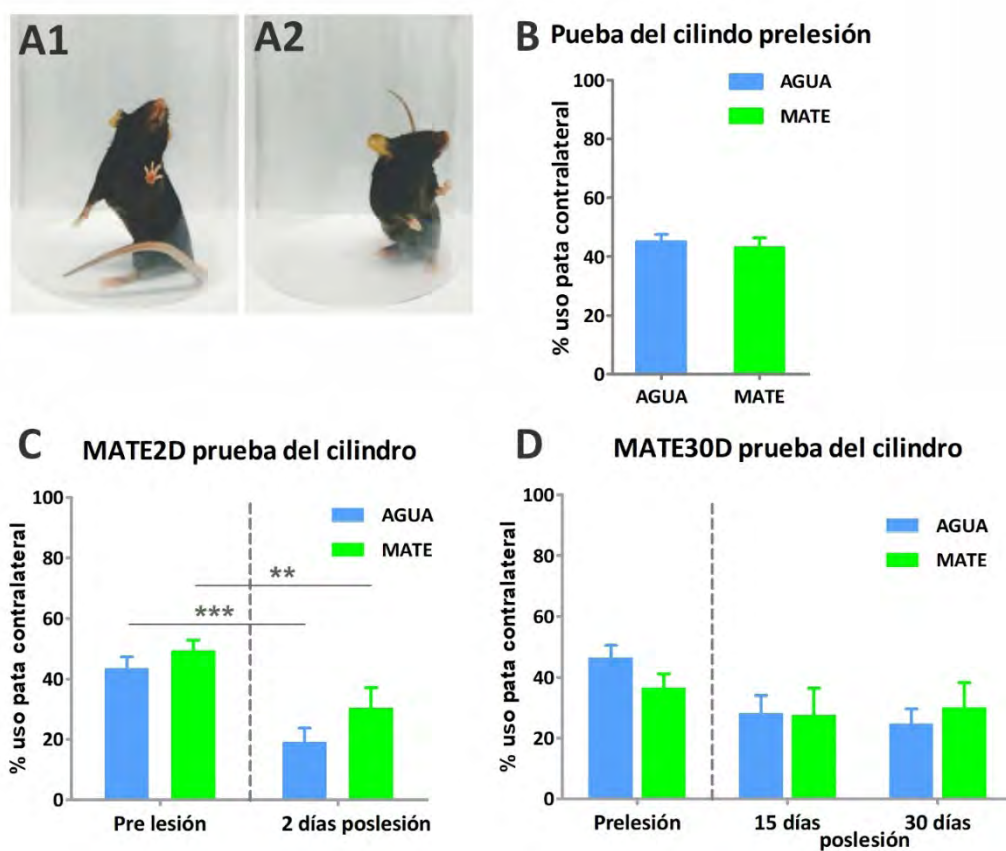


Figura 6: Evaluación en la prueba del cilindro. A1-2. Imágenes que muestran la realización de la prueba del cilindro por parte de un ratón lesionado en las que se pueden ver claramente su preferencia de apoyo de la pata ipsilateral al hemisferio lesionado (**A1**) y la retracción de la pata delantera contralateral (**A2**). Se grafica el porcentaje de uso de la pata delantera contralateral a la lesión en la prueba del cilindro: **B.** antes de la lesión para todos los animales (AGUA $n=12$, MATE $n=12$), **C.** prelesión y 2 días poslesión para el sub grupo de animales tratados con sus respectivos tratamientos por 2 días luego de la lesión (AGUA $n=6$, MATE $n=6$) y **D.** prelesión, 15 y 30 días poslesión para el sub grupo de animales que recibieron sus respectivos tratamientos durante 30 días poslesión (AGUA $n=6$, MATE $n=6$). (media \pm EEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6. Determinación de compuestos bioactivos en el plasma de ratones tratados con YM mediante HPLC.

A fin de verificar el nivel de absorción de algunos de los principales compuestos bioactivos se determinó su presencia en el plasma de ratones tratados con AGUA y MATE mediante HPLC, para ambos sets experimentales (subgrupos 2D y 30D).

Como era esperable, para los grupos de animales AGUA, no se encontraron compuestos propios de la YM (resultados no mostrados). Para el grupo de animales MATE, se hallaron los siguientes compuestos: ácido clorogénico, cafeína, teobromina y rutina (Figura 7). El análisis estadístico para cada compuesto analizado por separado indica que no hay diferencias significativas en la concentración determinada en el plasma de los animales del grupo MATE sacrificados a los 2 días poslesión y a los 30 días poslesión (prueba no paramétrica Mann Whitney para muestras independientes). Esto indica que independientemente luego del tiempo que ha transcurrido poslesión no se ve afectada la absorción o metabolismo de estos compuestos y permite pensar que tampoco se verían afectadas las concentraciones alcanzadas a nivel central, al menos para los cuatro compuestos determinados.

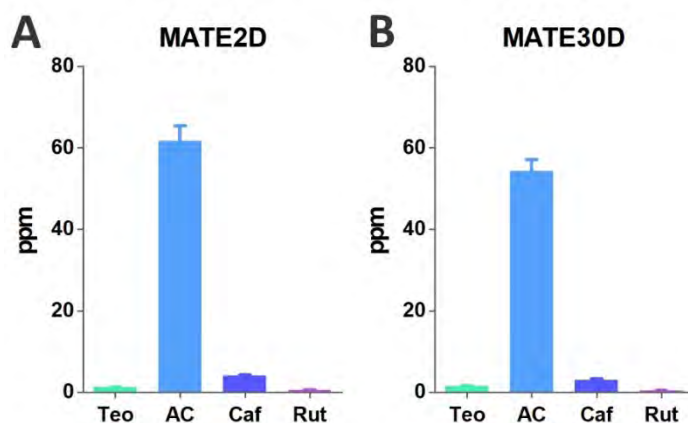


Figura 7: Determinación de compuestos bioactivos en el plasma de ratones tratados con YM mediante HPLC. Concentración (ppm) de los cuatro compuestos determinados en el plasma de ratones tratados con extracto de YM obtenida por cebada simulada diluido al medio, sacrificados a los 2 días poslesión (A) y a los 30 días poslesión (B). Se realizaron las determinaciones por triplicado (media±DE). Teo: teobromina, AC: ácido clorogénico, Caf: cafeína, Rut: rutina.

7. Determinación de la capacidad antioxidante de homogenatos de mesencéfalo ventral y estriado mediante el ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ensayo del ABTS.

El ensayo ABTS es una técnica que se emplea para medir la capacidad antioxidante de materiales biológicos, utilizando un compuesto coloreado de naturaleza radical, que simula especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. El agregado de antioxidantes que reaccionen con el radical decolora la solución, lo que se mide espectrofotométricamente.

El análisis estadístico de la prueba TEAC en el estriado lesionado mediante un ANOVA de dos vías mostró una interacción significativa entre tiempo y tratamiento ($p=0,0449$). Se observó un efecto significativo del tiempo poslesión sobre la capacidad antioxidante en los animales del grupo MATE ($p<0,05$), pero no en los animales del gru-

po AGUA ($p > 0,05$) (Figura 8A). En el mesencéfalo ventral, aunque no hubo interacción entre tiempo posesión y tratamiento, la capacidad antioxidante aumentó significativamente a los 30 días posesión en ambos grupos ($p = 0,0144$), (Figura 8B).

Los resultados sugieren que tanto a los 2 días como a los 30 días posesión, el consumo de YM no induce un aumento en la capacidad antioxidante en el tejido del núcleo estriado respecto al AGUA. Sin embargo, se observa mayor capacidad antioxidante a los 30 días posesión respecto a los valores que presenta el tejido a los 2 días solamente en los animales tratados con YM. En relación al mesencéfalo ventral, se observa un incremento en la capacidad antioxidante a los 30 días posesión en ambos grupos, independientemente del tratamiento. Estos hallazgos sugieren preliminarmente que el tratamiento con YM no neutraliza fuertemente el efecto antioxidante inducido por la 6-OHDA en el estriado. El posible efecto antioxidante de la YM no se reflejaría en los niveles de capacidad antioxidante del tejido en el sitio de inyección. Es necesario continuar investigando otros sistemas antioxidantes para comprender el estado de los sistemas homeostáticos tisulares frente a la injuria provocada por 6-OHDA y determinar si la administración de YM modula estos sistemas.

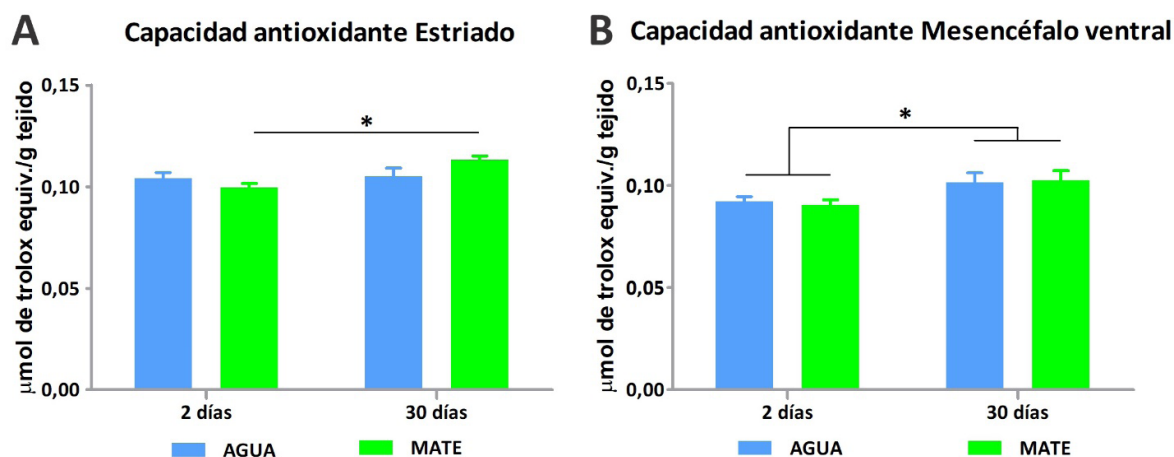


Figura 8: Capacidad antioxidante determinada por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). En el gráfico se muestran los valores de μmol de TEAC/g de tejido húmedo para el estriado (A) y el tejido correspondiente al mesencéfalo ventral (B). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Se consideró que existe diferencia significativa cuando $p < 0,05$ (media \pm EEM).

8. Determinación del grado de desnervación dopaminérgica: Inmunohistoquímica para TH.

En el estriado, la evaluación del porcentaje de área TH-inmunoreactiva (TH-ir) en el hemisferio inyectado con 6-OHDA sobre secciones coloreadas con DAB (Figura 9A1-2) ha permitido evaluar la integridad de las terminales dopaminérgicas tras la injuria. En este estudio, observamos una mayor inmunorreactividad de TH en las terminales del cuerpo estriado en animales tratados con YM (Figura 9B). Este hallazgo es consistente con resultados previos, en los que demostramos que el tratamiento prolongado con YM ejerce un efecto benéfico sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas ante la injuria inducida 6-OHDA.

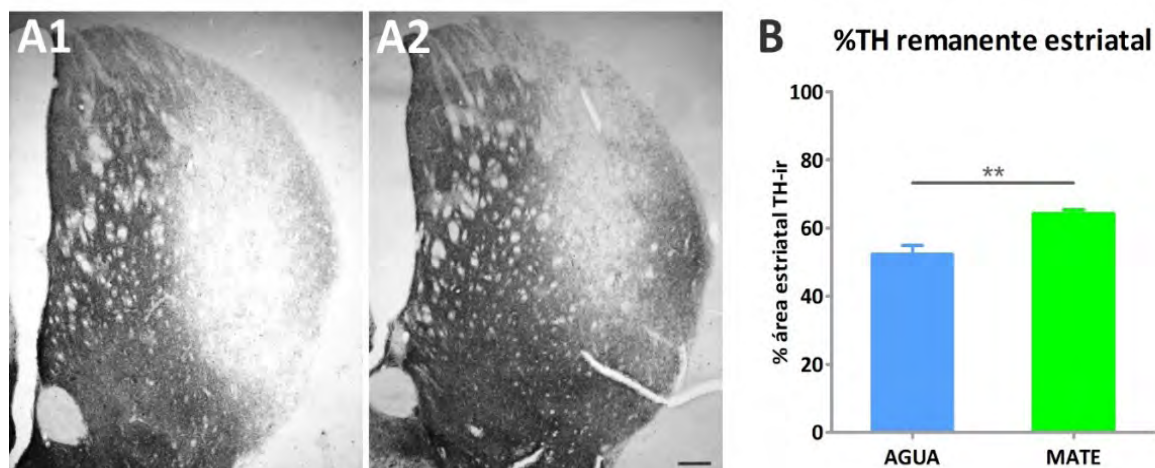


Figura 9: Inmunoreactividad para TH en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA. A1. Imagen representativa de un corte inmunomarcado para TH con DAB correspondiente a un animal del grupo AGUA. **A2.** Imagen correspondiente a una animal tratado con MATE. **B.** Porcentaje de área TH-inmunoreactiva (TH-ir) en el estriado inyectado con 6-OHDA de animales que recibieron AGUA (n=8): 52,21±2,61%, o MATE (n=7): 64,13±1,29%. Prueba t de Student para muestras independientes (media ± EEM. **p<0,01). Escala 200 µm.

9. Inmunohistoquímica para GFAP en tejido fijado: estudio preliminar.

Los animales del segundo grupo experimental continuaron con sus respectivos tratamientos por 30 días después de la lesión. Se realizó una inmunohistoquímica colorimétrica para GFAP y se cuantificó el nivel de inmunoreactividad en el núcleo estriado (Figura 10A1-2). El análisis de la densidad óptica mostró un aumento en la inmunoreactividad de GFAP en el grupo AGUA, en comparación con el grupo MATE según la prueba t de Student para muestras independientes (p=0,0389) (Figura 10B). Esto sugiere que el tratamiento a largo plazo con YM induciría una modulación de la expresión de GFAP en el núcleo estriado luego de la inyección de 6-OHDA. En respuesta a estímulos patológicos como una lesión, enfermedad o infección del sistema nervioso central, los astrocitos experimentan remodelación morfológica, molecular y funcional y se vuelven reactivos. La activación astrocitaria suele estar acompañada de una regulación positiva de GFAP.⁴³ Estos hallazgos llevan a pensar que la YM podría modular mecanismos antiinflamatorios contribuyendo a la neuroprotección observada, al reducir la astrogliosis; particularmente reduciendo la reactividad astrogliosa, caracterizada por la reducción en la hipertrofia del cuerpo celular y sus procesos. Avanzar en el análisis de la morfología de los astrocitos, permitirá evidenciar la proporción de astrocitos reactivos neurotóxicos y los posibles cambios asociados al tratamiento.

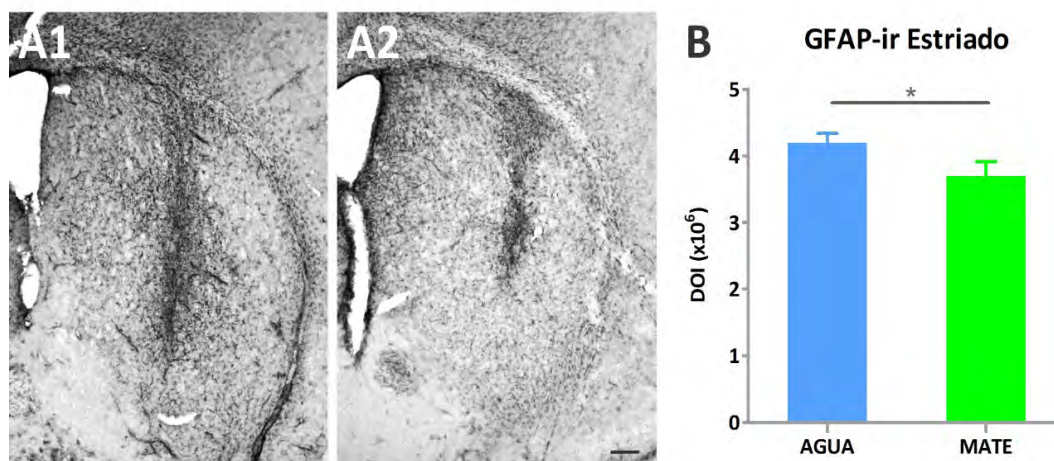


Figura 10: Inmunomarcación de GFAP en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA. A1. Microfotografía representativa de un corte inmunomarcado para GFAP con DAB correspondiente a un animal del grupo AGUA. **A2.** Imagen correspondiente a una animal tratado con MATE. **B.** El análisis de la densidad óptica integrada mostró una disminución en la inmunoreactividad de GFAP en el grupo MATE en comparación con el grupo AGUA ($p=0,0389$). Prueba de t de Student para comprobar la significación estadística (media \pm EEM; * $p<0,05$). Escala 200 μ m.

Conclusiones

En el marco del presente proyecto hemos podido caracterizar la presencia y estabilidad de los principales compuestos bioactivos en el extracto acuoso de YM, la que ha sido exitosamente administrada a los animales bajo tratamiento. La determinación de estos compuestos bioactivos en el plasma de ratones tratados con YM indica que luego de la lesión no se ve afectada la absorción o metabolismo de estos compuestos, lo que permite especular que no se afectarán las concentraciones alcanzadas a nivel central, al menos para los cuatro compuestos determinados.

Hemos observado que los animales que reciben yerba mate (YM) tienden a moverse más que aquellos que reciben agua, tanto antes como después de la lesión. Los resultados preliminares sugieren que el tratamiento con YM no contrarresta de manera significativa el efecto prooxidante inducido por la 6-OHDA en el estriado. Esto indica que el posible efecto antioxidante de la YM no se reflejaría en los niveles de capacidad antioxidante del tejido en el sitio de inyección de la toxina, tal como lo hemos determinado. Aunque el análisis de los niveles de estrés oxidativo y antioxidantes tisulares aún está en curso, los resultados obtenidos hasta el momento nos llevan a pensar que el mecanismo por el cual la YM podría inducir neuroprotección en el sistema dopaminérgico nigroestriatal podría estar relacionado con su capacidad antiinflamatoria y no directamente con su capacidad antioxidante.

Indicadores de producción

Presentaciones a Congresos Nacionales

Tribbia LT., Belforte JE., Murer MG., Gershanik OS., Taravini IRE. *New insights into the range of behaviors induced by the dopamine D1 agonist SKF-38393 in normal and hemiparkinsonian mice.* XXXV Congreso Anual (VIRTUAL) de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia. 7-9 de octubre de 2020.

Pretell Annan CA., Tribbia LT., La lacona G., Taravini IRE, Pafundo DE., Belforte JE. *Sparse labelling with AAV-PHP.eB, a noninvasive gene delivery method: Optimization of a protocol for morphological and anatomical connectivity analyses*. XXXV Congreso Anual (VIRTUAL) de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia. 7-9 de octubre de 2020.

Schenk M., Ferrario M., Bernardi, MA., Ballesteros P., Rivero R., Taravini IRE., Ferrario JE., Guerrero S. *Desarrollo de un extracto de yerba mate (ilex paraguariensis) de interés industrial mediante ultrasonido de alta intensidad. Optimización y estudios in vitro*. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos y XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Católica Argentina, Sede Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina. 20-22 de noviembre de 2019. Publicado en el libro de trabajos completos CyTAL®-ALACCTA 2019: parte I, 2020. ISBN 978-987-47615-0-7.

Tribbia LT., Gomez G., Cura AC., Rivero RC., Bernardi MA., Ferrario JE., Baldi- Coronel B., Gershanik OS., Gatto EM., Taravini IRE. *Dopaminergic neuroprotection induced by yerba mate: experimental evidence in hemiparkinsonian animals*. XXXIV Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia. Córdoba, Argentina. 3-5 de octubre de 2019.

Tribbia LT., Gomez G., Cura AC., Rivero RC., Bernardi MA., Ferrario JE., Baldi- Coronel B., Gershanik OS., Gatto EM., Taravini IRE. *Yerba Mate y Enfermedad de Parkinson. Efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal*. III Congreso de Bromatología y Nutrición. Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina. 5 y 6 de septiembre de 2019.

Presentaciones a Congresos Internacionales

Taravini IRE., Gomez G., Tribbia LT., Cura AC., Rivero RC., Bernardi MA., Ferrario JE., Baldi- Coronel B., Gershanik OS., Gatto EM. *Dopaminergic Neuroprotection Induced by Long-Term Intake of Yerba Mate: Behavioral and Histological Evidence in Hemiparkinsonian Mice*. 3rd Pan American Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, Miami, Florida, USA, 14-16 febrero 2020. Publicado en Movement Disorders, Vol 7, Supplement 1, 2020.

Gomez G., Tribbia LT., Cura AC., Rivero RC., Bernardi MA., Ferrario JE., Baldi- Coronel B., Gershanik OS., Gatto EM., Taravini IRE. *Neuroprotective effect of Yerba Mate (ilex paraguariensis) intake on dopaminergic neurons in a mice model of Parkinson's disease*. Neuroscience 2019, Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, Illinois, USA 19-23 octubre 2019.

Taravini IRE, Gomez G., Tribbia LT., Cura AC., Rivero RC., Bernardi MA., Ferrario JE., Baldi- Coronel B., Gershanik OS., Gatto EM. *Yerba mate tea (Ilex paraguariensis) exerts a neuroprotective effect on intrastriatal 6-OHDA-lesioned mice model of Parkinson's disease*. 2019 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Niza, Francia 22-26 septiembre 2019. Publicado en Movement Disorders, Vol 34, Supplement 2, 2019.

Cursos dictados como consecuencia de la investigación realizada

Conferencia: "Neuroprotección dopaminérgica inducida por yerba mate: evidencias experimentales en animales hemiparkinsonianos". Disertante: Taravini, IRE. III Congreso de Bromatología y Nutrición. Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina. Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos. 5 y 6 de septiembre de 2019

Bibliografía

1. Fritsch T., Smyth KA., Wallendal MS., Hyde T., Leo G., Geldmacher DS. Parkinson disease: research update and clinical management. *South Med J.* 2012;105(12):650-6, doi: 10.1097/SMJ.0b013e318273a60d.
2. Kish SJ., Shannak K., Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med.* 1988;318(14):376-80.
3. de Lau L., Breteler M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5(6):525-35.
4. Kiebertz K., Wunderle KB. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord.* 2013;28(1):8-13, doi: 10.1002/mds.25150.
5. Elbaz A., Tranchant C. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2007;262(1-2):37-44, doi: 10.1016/j.jns.2007.06.024.
6. Hernán MA., Takkouche B., Caamaño-Isorna F., Gestal-Otero JJ. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2002;52(3):276-84, doi: 10.1002/ana.10277.
7. Michel PP., Hirsch EC., Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron.* 2016;90(4):675-91, doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.038.
8. Schapira AH., Jenner P. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2011;26(6):1049-55, doi: 10.1002/mds.23732.
9. Lin MT., Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006;443(7113):787-95, doi: 10.1038/nature05292.
10. Jin H., Kanthasamy A., Ghosh A., Anantharam V., Kalyanaraman B., Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(8):1282-94, doi: 10.1016/j.bbdis.2013.09.007.
11. Koppula S., Kumar H., More SV., Kim BW., Kim IS., Choi D-K. Recent Advances on the Neuroprotective Potential of Antioxidants in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):10608-29, doi: 10.3390/ijms130810608.
12. Zhu J., Chu CT. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2010;20(s2):S325-34, doi: 10.3233/JAD-2010-100363.
13. Sian-Hülsmann J., Mandel S., Youdim MBH., Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2011;118(6):939-57, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07132.x.
14. Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2008;7(1):97-109, doi: 10.1016/S1474-4422(07)70327-7.
15. Block ML., Zecca L., Hong J-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(1):57-69, doi: 10.1038/nrn2038.
16. Filip R., Ferraro GE. Researching on new species of «Mate»: *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. *Eur J Nutr.* 2003;42(1):50-4, doi: 10.1007/s00394-003-0399-1.
17. González A., Ferreira F., Vázquez A., Moyna P., Paz EA. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1993;39(3):217-20.

18. Ranilla LG., Kwon Y-I., Apostolidis E., Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour Technol.* 2010;101(12):4676-89, doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.093.
19. Schinella G., Fantinelli JC., Mosca SM. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nutr.* 2005;24(3):360-6, doi: 10.1016/j.clnu.2004.11.013.
20. Heck Cl., De Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007;72(9), doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.
21. Branco C dos S., Scola G., Rodrigues AD., Cesio V., Laprovitera MJ., Heinzen H., et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. *Brain Res Bull.* 2013;92:60-8, doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.11.008.
22. De Moraes Reis E., Schreiner Neto FW., Berg Cattani V., Peroza LR., Busanello A., Queiroz Leal C., et al. Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014, doi: 10.1155/2014/958209.
23. Santos ECS., Bicca MA., Blum-Silva CH., Costa APR., dos Santos AA., Schenkel EP., et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. *Neuroscience.* 2015;292:13-21, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.004.
24. Colpo G., Trevisol F., Teixeira AM., Fachinetti R., Pereira RP., Athayde ML., et al. *Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats. *Neurotox Res.* 2007;12(3):171-80, doi: 10.1007/BF03033914.
25. Gatto EM., Melcon C., Parisi VL., Bartoloni L., Gonzalez CD., Mabel Gatto E., et al. Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study. *J Neurol Sci.* 2015;356(1-2):163-7, doi: 10.1016/j.jns.2015.06.043.
26. Milioli EM., Cologni P., Santos CC., Marcos TD., Yunes VM., Fernandes MS., et al. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. *Phytother Res.* 2007;21(8):771-6, doi: 10.1002/ptr.2166.
27. Bixby M., Spieler L., Menini T., Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sci.* 2005;77(3):345-58, doi: 10.1016/j.lfs.2004.11.030.
28. Bracesco N., Dell M., Rocha A., Behtash S., Menini T., Gugliucci A., et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Med.* 2003;9(3):379-87, doi: 10.1089/107555303765551606.
29. Schinella GR., Troiani G., Dávila V., de Buschiazzi PM., Tournier HA. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269(2):357-60, doi: 10.1006/bbrc.2000.2293.
30. Bastos DHM., Ishimoto EY., Ortiz M. Marques M., Fernando Ferri A., Torres EAFS. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J Food Compos Anal.* 2006;19(6-7):538-43, doi: 10.1016/J.JFCA.2005.03.002.

31. Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(2):338-44, doi: 10.1006/bbrc.1996.1030.
32. Schildknecht S., Gerding HR., Karreman C., Drescher M., Lashuel HA., Outeiro TF, et al. Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies. *J Neurochem.* 2013;125(4):491-511, doi: 10.1111/jnc.12226.
33. Scipioni GP, Ferreyra DJ, Acuña MG., Schmalko ME. Rebaudioside A release from matrices used in a yerba maté infusion. *J Food Eng.* 2010;100(4):627-33, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.05.011.
34. Hartwig VG., Brumovsky LA., Fretes MR. A Total Polyphenol Content of Mate (*Ilex paraguariensis*) and Other Plants-derived Beverages. *J Food Res.* 2012;1(3), doi: 10.5539/jfr.v1n3p58.
35. Paxinos G., Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2 Edition. . San Diego:Academic Press.; 2001.
36. Escande M V., Taravini IRE., Zold CL., Belforte JE., Murer MG. Loss of Homeostasis in the Direct Pathway in a Mouse Model of Asymptomatic Parkinson's Disease. *J Neurosci.* 2016;36(21):5686, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0492-15.2016.
37. Lundblad M., Usiello A., Carta M., Håkansson K., Fisone G., Cenci MA. Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol.* 2005;194(1):66-75, doi: 10.1016/j.expneurol.2005.02.002.
38. Schallert T., Fleming SM., Leasure JL., Tillerson JL., Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology.* 2000;39(5):777-87, doi: 10.1016/S0028-3908(00)00005-8.
39. Katalinic V., Modun D., Music I., Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2005;140(1):47-52, doi: 10.1016/J.CCA.2005.01.005.
40. Taravini IR., Chertoff M., Cafferata EG., Courty J., Murer MG., Pitossi FJ, et al. Pleiotrophin over-expression provides trophic support to dopaminergic neurons in parkinsonian rats. *Mol Neurodegener.* 2011;6(1):40, doi: 10.1186/1750-1326-6-40.
41. Brun LR., Brance ML., Lombarte M., Maher MC., Di Loreto VE., Rigalli A. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on Histomorphometry, Biomechanics, and Densitometry on Bones in the Rat. *Calcif Tissue Int.* 2015;97(5):527-34, doi: 10.1007/s00223-015-0043-0.
42. Sánchez-Iglesias S., Rey P., Méndez-Álvarez E., Labandeira-García JL., Soto-Otero R. Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2007;32(1):99-105, doi: 10.1007/s11064-006-9232-6.
43. Rodrigues RWP., Gomide VC., Chadi G. Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. *Int J Neurosci.* 2001;109(1-2):91-126, doi: 10.3109/00207450108986528.

PID 9104 Denominación del Proyecto

Disección de los mecanismos de acción neuroprotectora de la yerba mate sobre las neuronas nigroestriatales en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson

Directora

Taravini, Irene Rita Eloísa

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Bromatología

Contacto

irene.taravini@uner.edu.ar

Cátedra/s, área o disciplina científica

Laboratorio de Neurobiología Experimental. Área Ciencias Médicas y de La Salud.

Convenios:

Acuerdo de confidencialidad y colaboración (CONFIDENTIALITY AGREEMENT) entre el Prof. Dr. Jorge Gonçalves, Department of Systems Control, Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg y la Dra. Irene Taravini, Laboratorio de Neurobiología Experimental (UNER). Proyecto: "Study of differential gene expression profile of the whole rat transcriptome obtained from a microarray applied to the striatum of a rat model of early Parkinson's disease undergoing two different treatment regimens with either levodopa or pramipexole in clinically meaningful doses".

Integrantes del proyecto

Docente: CURA, ANDREA CECILIA. Colaboradora: TRIBBIA, LILIANA TERESITA. Becaria PID: NELSON MOHR, AYLEN

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

16/05/2019 y 07/04/2023

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 439/23 (24-11-2023)