



UNIVERSIDAD JUAN AGUSTÍN MAZA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA VETERINARIA

**Efecto beneficioso de *Tessaria absinthioides* sobre la disfunción
intestinal generada en explantes intestinales y en ratones con síndrome
metabólico**

Autor: Sofía Padilla

Tutor: Dra. Isabel M. Quesada

Investigadora adjunta de CONICET, Profesora adjunta de la Cátedra de
Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas UNCuyo.

Mendoza, febrero 2023

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO.....	4
1. Síndrome Metabólico.....	4
2. Disfunción intestinal.....	5
3. Tessaria Absinthioides	6
4. Modelos Biológicos para el Síndrome Metabólico	7
METODOLOGÍA.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	9
FIGURA 2.....	13
FIGURA 3.....	14
FIGURA 4.....	16
FIGURA 5.....	18
FIGURA 6.....	19
FIGURA 7.....	20
FIGURA 8.....	21
FIGURA 9.....	22

RESUMEN

La disfunción intestinal consiste en una función de barrera defectuosa, que permite la entrada de endotoxinas lumenales, causando inflamación intestinal. Recientemente se ha asociado a patologías relacionadas con el metabolismo y/o la dieta, especialmente la obesidad. El estrés oxidativo también está implicado en una amplia gama de trastornos intestinales. El aumento de especies reactivas de oxígeno puede alterar la integridad de las células epiteliales y la barrera intestinal al disminuir las uniones estrechas y la cantidad de células. *Tessariaabisinthioides* (*Ta*) es una planta nativa de América del Sur con usos etnofarmacológicos reportados. No hay evidencia de los efectos de promoción de la salud intestinal de *Ta*. Los resultados previos del grupo de investigación mostraron que un extracto acuoso de *Ta* podría prevenir la permeabilidad intestinal *ex vivo*. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar los posibles efectos antioxidantes y antiinflamatorios en explantes intestinales *ex vivo* y evaluar los efectos beneficiosos sobre los parámetros metabólicos, el estado oxidativo y la permeabilidad intestinal de tres dosis diferentes de decocciones de *Ta* en ratones ApoE-KO alimentados con una dieta alta en grasas (DG).

Palabras claves: Disfunción intestinal. Plantas medicinales. Inflamación. Estrés oxidativo. Síndrome metabólico.

ABSTRACT

Intestinal dysfunction consists of a defective barrier function, which allows the entry of luminal endotoxins, causing intestinal inflammation. It has recently been associated with pathologies related to metabolism and/or diet, especially obesity. Oxidative stress is also implicated in a wide range of intestinal disorders. Increased reactive oxygen species can alter the integrity of epithelial cells and the intestinal barrier by decreasing tight junctions and cell numbers. *Tessariaabisinthioides* (*Ta*) is a plant native to South America with reported ethnopharmacological uses. There is no evidence of the intestinal health promoting effects of *Ta*. Previous results from the research group showed that an aqueous extract of *Ta* could prevent intestinal permeability *ex vivo*. Therefore, the aim of this study was to evaluate the possible antioxidative and anti-inflammatory effects in *ex vivo* intestinal explants and to evaluate the beneficial effects on metabolic parameters, oxidative status and intestinal permeability of three different doses of *Ta* decoctions in ApoE-KO mice fed with a high fat diet (DG).

Keywords: Intestinal dysfunction. Medicinal plants. Inflammation. Oxidative stress. Metabolic syndrome.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha sobre los efectos de diferentes compuestos naturales, tanto *in vitro* como *in vivo*, abordan el problema utilizando modelos de citoquina, endotoxina o inflamación intestinal inducida químicamente para abordar la inflamación severa, aguda o crónica, pero pocos estudios abordan el efecto específico de los compuestos naturales sobre las alteraciones intestinales asociadas a la obesidad.

Aunque la inflamación intestinal grave, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal y la inflamación intestinal asociada a la obesidad, muestran diferentes grados de gravedad, ambas comparten vías y mecanismos comunes.

Teniendo en cuenta estos factores, este proyecto pretende evidenciar *in vivo* y *ex vivo* los efectos de *Tessaria absinthioides* en la modulación de la respuesta inflamatoria intestinal, el estrés oxidativo y la integridad de la barrera asociados a la obesidad y síndrome metabólico.

MARCO TEÓRICO

1. Síndrome Metabólico

Si bien podemos hallar varias definiciones del síndrome metabólico en muchas organizaciones de salud, la OMS lo describe como una condición patológica caracterizada por obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hiperlipidemia e hipertensión. Esta enfermedad no transmisible (ENT) conocida también como síndrome X, resistencia a la insulina, entre otros, comenzó en el mundo occidental, pero en la actualidad ya se considera un peligro para la salud a nivel global. Las causas más frecuentes de esta enfermedad son el aumento en el consumo de comidas rápidas con altas calorías y bajo porcentaje en fibras, disminución del ejercicio físico, y sedentarismo. Este síndrome conlleva al desarrollo de otras patologías como diabetes tipo 2, enfermedades coronarias, accidentes cerebrovasculares y otras discapacidades [1].

Se deben considerar los factores de riesgo primarios (sobrepeso y obesidad, tabaquismo, sedentarismo, dislipidemia, hipertensión arterial primaria, inflamación e hipercoagulabilidad, antecedentes familiares, etnia, edad y género), esto además incluye las manifestaciones derivadas de la insulino resistencia como la dislipidemia aterogénica, hipertensión arterial e hiperglicemia, muchas de ellas también son consideradas constituyentes del síndrome metabólico [2].

Es de vital importancia conocer verdaderamente la entidad en estudio, que prevalencia presenta, cuáles son sus consecuencias clínicas y como tratarlas y prevenirlas correctamente [3]. El estudio del síndrome metabólico apunta a diversos objetivos como mejorar la calidad de vida de los individuos, disminuir su peso corporal y adiposidad visceral, controlar factores de riesgo del paciente, prevenir la diabetes y eventos cardiovasculares a futuro [2].

En cuanto a la alimentación, la dieta occidental sería una correcta ejemplificación para un factor desencadenante del síndrome metabólico. Se caracteriza por el consumo alto en grasas y el exceso de alimento ingerido, frecuencia de alimentación inadecuada y estado postprandial prolongado. Las

consecuencias de este tipo de alimentación, además de las alteraciones metabólicas, son disbiosis, disfunción de la barrera intestinal, aumento de la permeabilidad intestinal, fuga de bacterias tóxicas y metabolitos a la circulación. Esta dieta tiene estrecha relación con el estilo de vida occidental, en el que predominan la inactividad física y exposición al sol reducido, menos horas de descanso nocturno, estrés crónico, tabaquismo y contaminación del ambiente [4].

2. Disfunción Intestinal

El intestino es un órgano importante para el metabolismo, se ha visto que su papel ha llamado la atención en los últimos años ya que se ha identificado el rol del mismo en la fisiopatología de distintas enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes.

La función metabólica del intestino y la disfunción intestinal han causado un gran interés en la comprensión de los mecanismos involucrados para lograr identificar nuevas terapias y nuevos reguladores del metabolismo.

Recientemente se ha evidenciado que la comunidad microbiana intestinal o microbiota intestinal juega un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina y diabetes. Si ocurre alguna distorsión en las funciones de la microbiota o las vías de señalización, esto puede ocasionar en altas probabilidades múltiples enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades antiinflamatorias como atopías, enfermedad inflamatoria intestinal, estimulación inmune inapropiada, y enfermedades neoplásicas [5].

La microbiota o flora intestinal es una comunidad de múltiples microorganismos que habitan en el intestino y consta de más de 250 especies de bacterias, hongos, virus y arqueas. En una persona adulta el intestino puede albergar aproximadamente 10^{13} células bacterianas, esta condición es dinámica y suele variar a lo largo de su vida. A esta población bacteriana se la podría clasificar en tres enterotipos principales que se caracterizan por un género bacteriano de dominancia, *Bacteroides*, *Prevotella*, o *Ruminococcus*. Además de las diferencias existentes entre individuos, cabe resaltar que en un solo huésped hay condicionantes como la genética, la edad, la

dieta, los fármacos, la estructura del intestino incluida su pared, y factores ambientales que influyen sobre la misma [4].

Las funciones de la flora intestinal son amplias. Aporta vitaminas como tiamina, folato, biotina, riboflavina y ácido pantoténico, cumple un papel de protección contra patógenos exógenos, colabora a mantener la integridad de la barrera epitelial intestinal y es imprescindible para el desarrollo de la maduración del sistema inmunitario intestinal. La microbiota también influye en órganos distantes fuera del tracto intestinal, por ejemplo, la interacción entre el microbioma intestinal y el cerebro es llamado eje intestino-cerebro. Este está implicado en la regulación de la saciedad y la regulación hormonal e impacta el estado de ánimo y el comportamiento del individuo [4].

3. *Tessaria Absinthioides*

La preferencia por las plantas medicinales andinas endémicas es elevada, porque representan una gran fuente de extractos o compuestos activos novedosos biológica y farmacológicamente, los cuales han sido muy poco explorados. Estos pueden otorgar potenciales candidatos para el estudio de nuevos medicamentos y la preparación de alimentos funcionales y aditivos alimentarios. Una de las especies andinas endémicas más destacadas es *Tessaria absinthioides* (Hook. & Arn.) DC. (Asteraceae), su nombre vernáculo es “pájaro bobo” en Argentina y “Brea” en Chile. Se puede utilizar en forma de infusión o decocciones en la medicina tradicional como hipocolesterolémico, balsámico y expectorante y, para tratar insuficiencia renal, diabetes y trastornos digestivos [6-13]. Algunos estudios previos relacionados con su uso etnofarmacológico han demostrado que *Tessaria absinthioides* (*Ta*) posee propiedades insecticidas, repelentes, citoprotectoras, viricidas, antiinflamatorias, citotóxicas y antitumorales [10-16]. En referencia a su composición química, fueron aislados o identificados de sus partes aéreas principalmente sesquiterpenos, ácidos cafeoilquínicos, otros fenólicos y flavonoides [6,15].

El efecto combinado de estos compuestos químicos le atribuyen a *Tessaria absinthioides* propiedades hipocolesterolémicas debido a que los mismos presentan propiedades hipolipidémicas. Se ha reportado que el

consumo durante 6 semanas de una decocción de *Ta* mejora el colesterol total, colesterol HDL en suero y mejora la expresión de los receptores LXR en hígado de ratas que consumieron dieta grasa por 4 semanas [17].

En los últimos años ha alcanzado gran importancia el estudio de los efectos beneficiosos sobre la salud humana de los antioxidantes contenidos en productos naturales. Los absintidos de Argentina y Chile son recursos naturales reconocidos por sus propiedades antioxidantes y pueden mejorar la salud humana en aquellas enfermedades donde se ha demostrado la participación de radicales libres. Estos causan daños oxidativos y están involucrados en el inicio o progreso de muchas enfermedades crónicas, que van desde el cáncer hasta enfermedades cardiovasculares, incluidas aterosclerosis, hipertensión, insuficiencia cardíaca y disfunción cardíaca asociada a la diabetes [18,19].

4. Modelos biológicos para el Síndrome Metabólico

El ratón es un organismo modelo con muchas ventajas respecto a otros modelos genéticos. Al ser un mamífero, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre. Su tiempo generacional es muy corto, son muy prolíficos y se adaptan rápidamente a la vida en los bioterios, lo cual permite controlar variables ambientales en las experimentaciones. Desde el punto de vista genético es una de las especies de mamíferos mejor estudiadas junto con el hombre.

Existe una amplia cantidad de líneas genéticamente definidas, cientos de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles. Además, es el único animal que cuenta con sistemas eficientes de cultivos de células embrionarias pluripotenciales, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones *knock out* (KO) constitutivos y condicionales).

La información acumulada de un siglo de investigaciones permitió acceder a una inmensa cantidad de documentación sobre los fenotipos mutantes, las características de las líneas, los mapas genéticos y la secuencia completa del genoma, por todo esto se escoge al ratón como un organismo modelo en medicina experimental.

Encontramos mutaciones en varios genes murinos que sirven como modelo experimental en enfermedades metabólicas y hormonales. Por ejemplo, los ratones KO para los genes ApoE y Ldlr.

El primero desarrolla hipercolesterolemia y lesiones arterioscleróticas a temprana edad, inclusive si se los alimenta con dietas de bajo contenido graso, en cambio los ratones Ldlr presentan un fenotipo más atenuado. Los dos modelos son muy útiles para el estudio del desarrollo de lesiones arterioscleróticas y para el ensayo de posibles terapias génicas [20].

Parte de este proyecto fue desarrollado utilizando el modelo animal experimental de aterosclerosis, el ratón deficiente en Apolipoproteína E (ApoE-KO o ApoE^{-/-}). El ratón silvestre es muy resistente a desarrollar aterosclerosis, incluso cuando se lo somete durante tiempo prolongado a dietas con un elevado contenido en colesterol y grasas [21]. Sin embargo, existen diversos modelos de ratones modificados genéticamente que presentan alta susceptibilidad a desarrollar aterosclerosis, como por ejemplo el ratón ApoE-KO el cual fue generado independientemente en 1992 por dos laboratorios [22,23]. Estos ratones son viables, fértiles y de tamaño similar a los silvestres. Las diferencias principales consisten en el perfil lipídico y lipoproteico, como se muestra en la figura 1. Así, el perfil lipoproteico de los ratones silvestres se caracteriza por niveles elevados de colesterol en forma de HDL, mientras que las lipoproteínas con tamaño correspondiente a muy baja densidad, baja o intermedia (VLDL, LDL e IDL respectivamente) se encuentran en niveles de trazas.

Por el contrario, los ratones ApoE-KO presentan una reducción muy significativa en los niveles de HDL y un aumento de los niveles de colesterol asociado a la fracción VLDL. Los niveles de triglicéridos, aunque estadísticamente elevados en ausencia de ApoE, pueden considerarse próximos a los normales. Básicamente la deficiencia en ApoE produce un cambio pro-aterogénico en el perfil lipídico y lipoproteico, permitiendo el desarrollo de lesiones ateromatosas, incluso de modo espontáneo, con un fenotipo similar al de las lesiones desarrolladas en humanos [21].

Es por esto que el ratón ApoE-KO constituye un modelo experimental muy adecuado para el estudio de la aterosclerosis. La progresión y la histopatología de las lesiones ateromatosas que se generan en estos animales,

presentan características similares a las observadas en humanos, incluyendo la presencia de estrías grasas, núcleos necróticos y cubiertas fibrosas [22,23]. Además, se ha demostrado la presencia de lesiones en la arteria braquioencefálica con características similares a las placas vulnerables de los humanos, incluyendo la formación de un núcleo necrótico, erosión de la masa necrótica a través de la luz arterial y hemorragia intraplaca [24].

Genotipo	Colesterol total (mg/dl)	Colesterol en HDL (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
Silvestre	86 ± 20	73 ± 28	73 ± 36
Heterocigotos	88 ± 22	75 ± 18	102 ± 40
Deficiente	434 ± 129	33 ± 15	123 ± 51

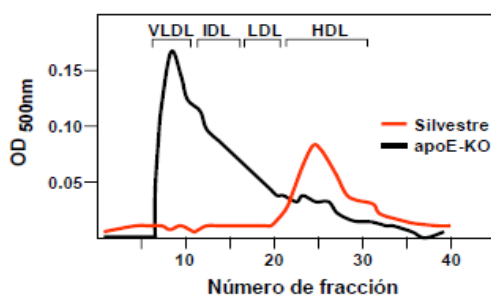


Figura 1. Perfil lipídico y lipoproteico del ratón deficiente en apolipoproteína E. Adaptación de Kashyap et al (1995)[33].

El ratón ApoE-KO desarrolla espontáneamente lesiones ateroscleróticas cuando se mantiene en dieta control, y este proceso se acelera al someterlo a dietas ricas en grasa. Las primeras lesiones observadas en un ratón ApoE-KO joven alimentado con dieta control se localizan en la aorta proximal y están formadas principalmente por monocitos. A las 10 semanas de edad, las lesiones están formadas por células “espumosas” y a partir de las 15 semanas de edad encontramos ya las lesiones intermedias, que se convierten en avanzadas cuando los ratones cumplen las 20 semanas de edad. Si al ratón ApoE-KO espontáneamente hipercolesterolémico, además se lo somete a una dieta grasa o rica en fructosa que induce un estado de resistencia a la insulina asociado, se obtiene un buen modelo de síndrome metabólico (SM) [21].

METODOLOGÍA

Hipótesis:

En base a los potenciales efectos anti-oxidantes y anti-inflamatorios de *Tessaria absinthioides* (*Ta*), la hipótesis es que su consumo influye sobre la salud intestinal, protegiendo contra la inflamación y el estrés oxidativo intestinal, así como también en la disfunción de la barrera intestinal provocados por una dieta obesogénica en modelos *in vivo* (ratones), o induciendo daño químico en modelos *ex vivo*.

Preguntas de Investigación:

- 1) ¿*Tessaria absinthioides* (*Ta*) tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios en explantes intestinales de ratón cuando éstos se someten a daño químico?, ¿mejora la permeabilidad intestinal?
- 2) ¿Estos resultados *ex vivo*, serán extrapolables en un sistema completo *in vivo* (ratones ApoE-KO alimentados con dieta grasa)?
- 3) ¿*Ta* posee efectos antioxidantes y antiinflamatorios en el intestino de ratones con síndrome metabólico?
- 4) ¿*Ta* tiene efectos beneficiosos en la permeabilidad intestinal aumentada por síndrome metabólico?
- 5) ¿Cuál de las dosis agudas administradas será la más efectiva?

Objetivos Generales:

El objetivo general de este proyecto es estudiar *ex vivo* e *in vivo*, la bioactividad molecular de un extracto de *Tessaria absinthioides* a nivel del tracto gastrointestinal, la capacidad de modificar la integridad de la barrera intestinal y su efecto antioxidante e inmunomodulador en el contexto de obesidad.

Objetivos Específicos:

1) Estudiar *ex vivo*, el efecto de *Ta* sobre la permeabilidad intestinal y sobre el estado de inflamación y de estrés oxidativo utilizando un sistema de explantes intestinales.

2) Estudiar *in vivo*, los efectos preventivos de diferentes concentraciones de *Ta* en el contexto de disfunción y disbiosis intestinal provocada por una dieta obesogénica en ratones.

3) Determinar *in vitro*, el poder antioxidante de *Ta* en células de adenoma colorrectal humano (CaCo).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE FRACCIÓN SOLUBLE:

Tessaria absinthioides se recolectó en el condado de Lavalle, Mendoza, Argentina (33°44'10"S, 68°21'30.5"W), y los especímenes testigo se depositaron en el Herbario Mendoza Ruiz Leal como MERL-61823 (*Ta*). Se prepararon decocciones de *Tessaria absinthioides* al 10% peso/volumen, a partir de 100 g. de planta (hojas) seca y molida, en 1 L de agua purificada. Después de 30 min. de ebullición, las decocciones se filtraron y enfriaron durante 24 Hs. en un congelador a -20°C, y posteriormente se liofilizaron tres muestras representativas de 100 ml de cada decocción en equipo LA-B3 RIFICOR (Buenos Aires, Argentina). Las muestras se almacenaron en un congelador a -20°C hasta su uso en los ensayos incluidos en este trabajo, en la cuantificación de fenoles y flavonoides, y en el análisis UHPLC-PDA-OT-MS. [16,17].

EXPLANTES INTESTINALES:

Se utilizaron ratones de descarte y el colon proximal se diseccionó y se lavó con solución buffer fosfato (PBS). De cada colon se tomaron secciones de 0,5 cm² de diámetro con punch de biopsia. Luego se despojó la capa muscular del epitelio liso subyacente. Las secciones se incubaron en placas de 12 o 24 wells y recibieron los siguientes tratamientos: se incubó una sección de tejido sólo en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), que representó a las muestras control. Otras secciones de tejido se incubaron en diferentes pocillos, cada uno con DMEM y adición de concentraciones crecientes de *Ta* (1, 10, 100 y 1000 mg/mL) durante 30 minutos (pre-tratamiento). Para inducir una respuesta inflamatoria, se expuso a 10 µg/mL de LPS (Sigma Aldrich). Todos los explantes de tejido se incubaron a 37°C durante 1 hora y después de esto, los sobrenadantes se almacenaron a -20 ° C, se extrajeron los medios sobrantes del tejido y el tejido se almacenó en -80°C (Figura 2).

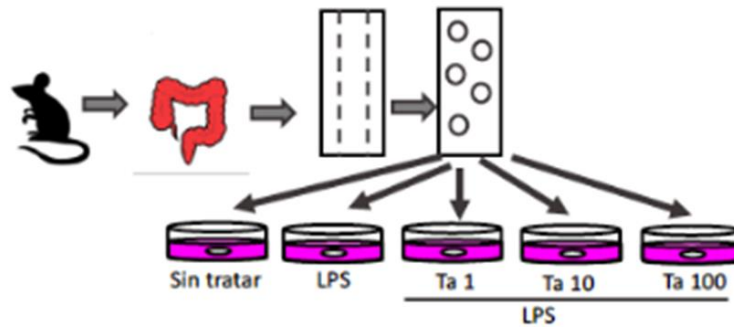


Figura 2. Representación gráfica de los tratamientos a los explantes intestinales de ratón.

DISEÑO DE ANIMALES Y ESTUDIOS DE LABORATORIO:

Los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos institucionales para experimentación con animales, aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo (aprobación Aval # 168/2019). El diseño del estudio que se siguió se muestra en la Figura 3. Ratones C57BL/6J ApoE-KO de 5 meses de edad (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, Estados Unidos) se alojaron en grupos, tuvieron acceso irrestricto a agua y comida estándar (GEPSA, Córdoba, Argentina) y se mantuvieron en un ambiente de 12 horas ciclo de luz/oscuridad. Los ratones se alimentaron con una dieta normal (grupo control), mientras que los otros grupos se trataron durante 4 semanas previas a la ingesta de dieta grasa al 30% (grasa bovina) con *Ta* (150, 300 y 450 mg/kg/día, respectivamente) en el agua de bebida. Un grupo de ratones fue alimentado con dieta rica en grasa bovina al 30% durante 6 semanas (Figura 3). Durante este tiempo se controló la dieta y el consumo de agua. Las muestras de sangre se recolectaron después de un período de ayuno de 4 h mediante punción cardíaca bajo anestesia (ketamina 80 mg/kg-midazolam 5 mg/kg). Las concentraciones de glucosa se midieron inmediatamente después de la extracción de sangre con un kit enzimático (1400101; Wiener Lab®, Rosario, Argentina). El colesterol total (CT) y los triglicéridos (TG) plasmáticos se determinaron mediante reacciones colorimétricas con kits comerciales (750220 y 791020, respectivamente; GT Lab, Buenos Aires, Argentina). Como indicador de peroxidación lipídica se

determinó malondialdehído plasmático (MDA) mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) con protocolo de laboratorio propio.

GRUPO CONTROL: ratones alimentados con dieta estándar y agua *ad libitum*.

GRUPO DIETA GRASA (DG): ratones alimentados con una dieta grasa al 30% de grasa vacuna y agua *ad libitum* durante 6 semanas.

GRUPO DIETA GRASA + Ta 30 (DG+30%Ta): ratones alimentados con una dieta grasa al 30% de grasa vacuna y consumo oral de Ta 30 % (150 mg/kg/día) *ad libitum*, consumo diario durante las cuatro primeras semanas, las 4 semanas previas al inicio de la dieta grasa.

GRUPO DIETA GRASA + Ta 60 (DG+60%Ta): ratones alimentados con una dieta grasa al 30% de grasa vacuna y consumo oral de Ta 60 % (300 mg/kg/día) *ad libitum*, consumo diario durante las cuatro primeras semanas, las 4 semanas previas al inicio de la dieta grasa.

GRUPO DIETA GRASA + Ta 100 (DG+100%Ta): ratones alimentados con una dieta grasa al 30% de grasa vacuna y consumo oral de Ta 100% (450mg/kg/día) *ad libitum*, consumo diario durante las cuatro primeras semanas, las 4 semanas previas al inicio de la dieta grasa.

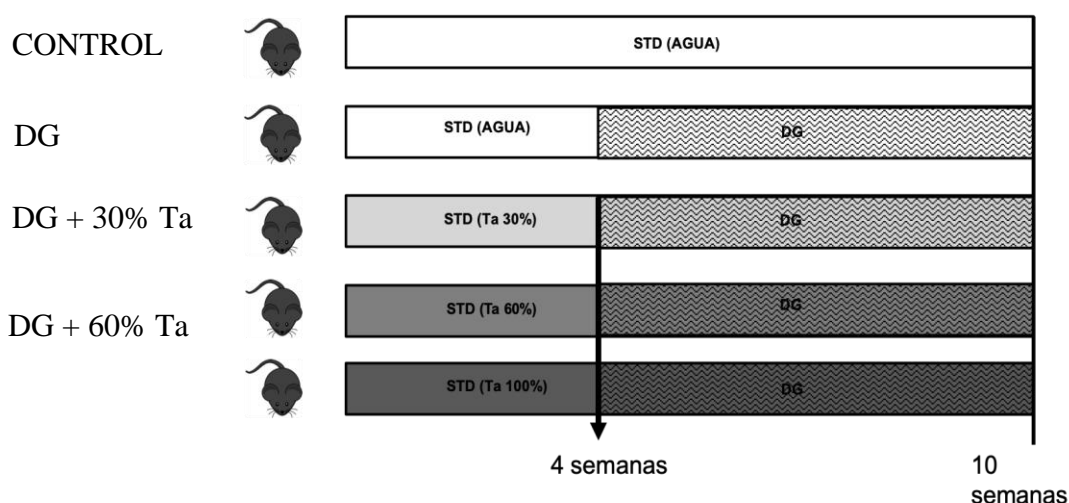


Figura3. Representación gráfica de los tratamientos a los animales.

TRANSCRIPCIÓN INVERSA CUANTITATIVA: ANÁLISIS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA:

El ARN total se aisló con TRIzol (Invitrogen, 15596026) de tejido intestinal. La qPCR en tiempo real se realizó con muestras de cDNA y EVA Green (31000; Biotium, Fremont, CA, Estados Unidos) utilizando un Rotor-Gene 6000 Series Software versión 1.7 (Corbett Life Science, Sydney, NSW, Australia). Los niveles de expresión génica de NOX2, MCP-1 y ZO-1 se normalizaron con Actina. Los niveles de ARNm se expresaron como una proporción, utilizando el método delta-delta para comparar los resultados de expresión relativa entre tratamientos. La expresión relativa se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS INTACTAS:

Los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno se midieron con el FluoroProbe CM-H2DCFDA (C400; Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las células Caco se cultivaron en una placa de 24 pocillos hasta la confluencia. Se aplicó *Ta* (2,5, 5, 10, 20 o 40 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos. Se midió la fluorescencia basal y luego se añadió 100 ng/mL de TNF alfa o LPS (A9525; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, Estados Unidos). La fluorescencia de las células estimuladas se midió continuamente durante 40 min en un fluorómetro de microplaca (Fluoroskan Ascent, Labsystems, Helsinki, Finlandia), $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados se expresaron como el valor medio \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias se evaluaron mediante la prueba ANOVA para comparar los grupos control y DG por un lado y el DG con los grupos DG más *Ta*. Se utilizó Tukey para identificar las diferencias significativas entre las comparaciones por pares. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron

estadísticamente significativos. Los cálculos se realizaron utilizando el software SPSS 17.0.

RESULTADOS

Resultados previos del grupo de investigación realizados en el grupo MoBioFood, de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona (España), mostraron la capacidad de *Ta* de prevenir el aumento de la permeabilidad intestinal inducida por Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) al 8%. La permeabilidad intestinal se evaluó en un sistema *ex vivo* de Ussing Chambers midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Los ensayos de Ussing chamber mostraron una reducción del 70% en TEER en colonos proximales de cerdos cuando fueron expuestos a DSS al 8% durante 1 hora ($P < 0,001$ vs controles). Cuando los intestinos se pretrataron 30 minutos con 100 mg/L de *Ta* o con *Prosopis Strombulifera* (*Ps*) antes de inducir daño intestinal con DSS, *Ta* pudo restaurar completamente la permeabilidad intestinal como intestinos no tratados (controles) ($P < 0,001$ vs DSS). El pretratamiento con *Ps* mejoró notablemente el TEER reducido provocado por DSS significativamente ($P < 0,05$ vs DSS), pero no lo restauró completamente como *Ta* (Figura 4). Este estudio proporcionó evidencia del efecto de mejora de los extractos de *Ta* y *Ps* sobre la disfunción de la barrera intestinal, medida por la permeabilidad intestinal.

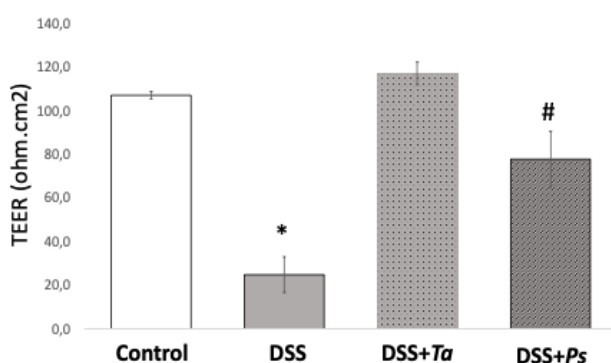


Figura 4. Efecto de *Ta* y *Ps* sobre la permeabilidad intestinal en explantes de colon proximal de cerdos expuestos a DSS. La permeabilidad intestinal se midió como resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en ohm.cm². Los datos son medias \pm SEM; * $p \leq 0.001$ vs Control; # $p \leq 0.05$ vs DSS.

EFFECTOS DE *TESSARIA ABSINTHIOIDES* EX VIVO:

***TESSARIA ABSINTHIOIDES* PREVIENE LA DISFUNCIÓN INTESTINAL EX VIVO.**

Dados los resultados previos del efecto beneficioso de *Ta* en la prevención de la permeabilidad intestinal, quisimos evaluar otros parámetros comprendidos en la disfunción intestinal como lo son la inflamación y el estrés oxidativo intestinal. Por ello, analizamos la bioactividad de un extracto de *Ta* en la inflamación y en la alteración de la permeabilidad intestinal inducida por LPS en un modelo *ex vivo* de explantes intestinales de ratón. Para estudiar los efectos preventivos de la disfunción intestinal (Figura 2) se realizó un pretratamiento de 30 minutos con tres concentraciones diferentes de *Ta* (1, 10 y 100 mg/mL), se indujo daño intestinal con 10 µg/mL de LPS durante 1 hora. Se analizó la expresión génica de NOX1, NOX2 (enzimas productoras de estrés oxidativo) y MCP-1 (molécula inflamatoria) mediante qRT-PCR (Figura 5). El tratamiento con 10 µg/mL de LPS fue capaz de producir aumento en la expresión tanto de NOX2 como de MCP-1. Las concentraciones 10 y 100 mg/mL de *Ta* disminuyeron significativamente la expresión de NOX2 ($P < 0,001$) y MCP-1 ($P < 0,05$). La concentración de 1 mg/mL de *Ta*, provocó una tendencia a disminuir la expresión de NOX2. No encontramos expresión de NOX1 en las condiciones probadas. Estos resultados preliminares sugieren que las concentraciones más altas de *Ta* tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios sobre el intestino y podría considerarse a *Ta* como un posible tratamiento de la disfunción intestinal.

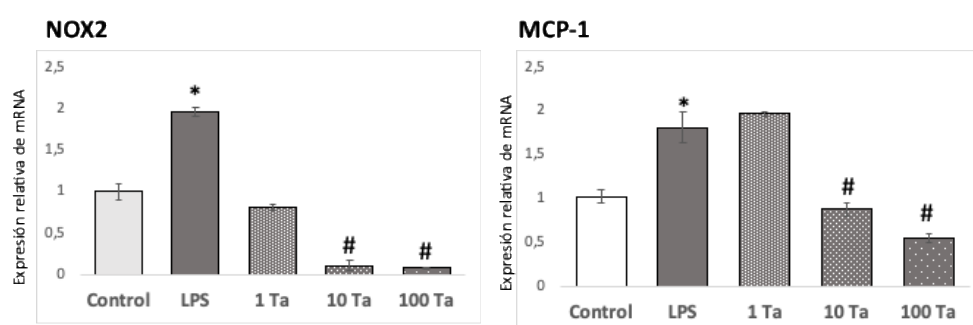


Figura 5. Efecto de *Ta* en la expresión génica de NOX2 y MCP-1 en explantes intestinales de ratón ApoE-KO determinados mediante qRT-PCR. Los datos son medias \pm SEM; * $p \leq 0.001$ vs Control; # $p \leq 0.05$ vs LPS.

EFFECTOS DE *TESSARIA ABSINTHIOIDES* IN VIVO:

Con el fin de conocer si los efectos beneficiosos de *Ta* sobre la disfunción intestinal *ex vivo*, son reproducibles en un sistema completo, teniendo en cuenta el metabolismo de *Ta* por la digestión e induciendo el daño intestinal de una forma más real mediante una dieta obesogénica, se realizó una prueba piloto con el objetivo de evaluar el posible efecto preventivo de la disfunción intestinal y, además, conocer cuál será la concentración más efectiva de *Ta*. Para ello, ratones ApoE-KO fueron separados en 5 grupos: control, dieta grasa (DG), ratones a los cuales se les administró *Ta* 30%, 60% y 100% 4 semanas previas al inicio de la dieta grasa (DG+*Ta*30%; DG+*Ta*60% y DG+*Ta*100%, respectivamente) (ver apartado de materiales y métodos).

EFFECTO DE *TESSARIA ABSINTHIOIDES* SOBRE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN RATONES APOE-KO ALIMENTADOS CON DIETA GRASA.

Como primera aproximación a conocer cuál de las concentraciones de *Ta* probadas tendrían efectos beneficiosos, determinamos tres pruebas bioquímicas que nos brindan información acerca del estado metabólico de los animales. Utilizando un modelo animal experimental de síndrome metabólico, como ratones ApoE-KO que consumieron dieta grasa durante 6 semanas, se investigaron los efectos de la ingesta *Ta* a diferentes concentraciones previas al inicio de la dieta grasa. El colesterol total fue aumentado en el grupo DG y el

pre-tratamiento con *Ta* parecería disminuir el colesterol total, siendo el efecto mayor *Ta* al 60%. En el caso de los triglicéridos, la DG no tuvo efecto en aumentar sus niveles, sin embargo, las concentraciones de 30 y 60% parecen disminuir los triglicéridos séricos. La glucemia fue aumentada en los animales que consumieron DG y su aumento pudo ser prevenido solo con la concentración más elevada de *Ta*(Figura 6). Cabe aclarar que los resultados en las variables bioquímicas corresponden a un solo animal por grupo, por lo que no pudo realizarse la estadística. Dado que estos primeros resultados no fueron concluyentes para la elección de la concentración más benéfica, se continuaron con los demás ensayos propuestos en los objetivos.

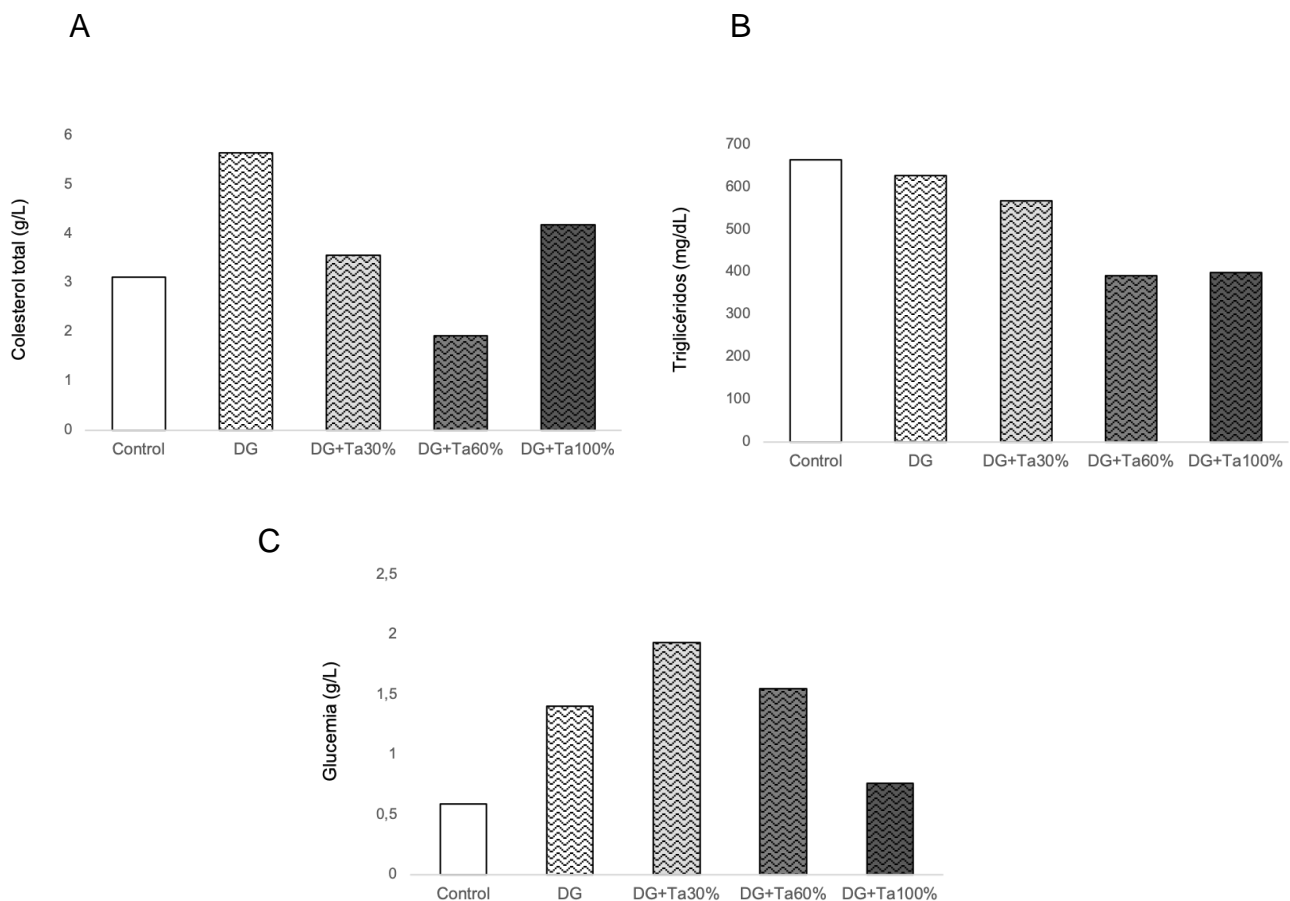


Figura 6. Efecto de *Ta* sobre variables bioquímicas: en (A) colesterol total, (B) trigliceridemia, (C) glucemia en ayunas en suero de ratones ApoE-KO que consumieron dieta grasa (DG), o que recibieron un pre-tratamiento con una decocción de *Ta* al 30% (DG+30%*Ta*), al 60% (DG+60%*Ta*) o al 100% (DG+100%*Ta*) durante 4 semanas.

TESSARIAABSINTHIOIDESPREVIENE EL ESTRÉS OXIDATIVO SISTÉMICO EN RATONES APOE-KO PROVOCADO POR EL CONSUMO DE DIETA GRASA.

Para abordar la capacidad de *Ta* para prevenir el estrés oxidativo sistémico, evaluamos el nivel de peroxidación lipídica a través del ensayo de TBARS en suero medido a través de la detección del malonilaldehído (MDA), uno de los productos finales formados en la peroxidación lipídica. Los resultados muestran que los animales que consumieron la dieta grasa, aumentaron los niveles de peroxidación lipídica significativamente, como se esperaba. El grupo de animales que consumió la decocción de *Ta* al 30% previo al inicio de la dieta grasa, se observó una tendencia a disminuir los niveles TBARS, pero las concentraciones más altas, *Ta* al 60% y 100%, impidieron el aumento de TBARS ocasionado por la dieta grasa de forma marcada y significativa (Figura 7).

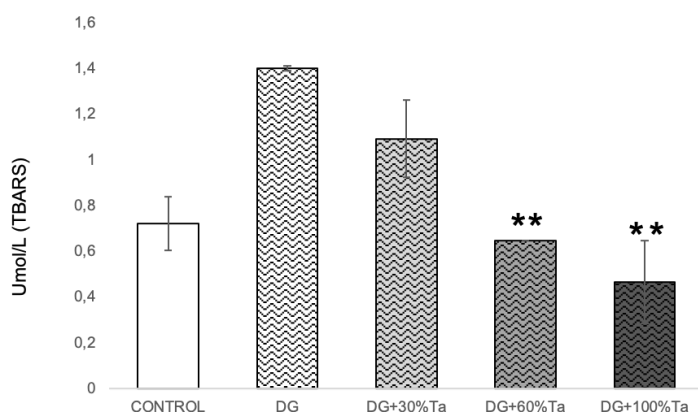


Figura 7. Efecto de *Ta* sobre TBARS en suero de ratones ApoE-KO que consumieron dieta grasa (DG), o que recibieron un pre-tratamiento con una decocción de *Ta* al 30% (DG+30%*Ta*), al 60% (DG+60%*Ta*) o al 100% (DG+100%*Ta*) durante 4 semanas. Los datos son medias \pm SEM ($n = 2$ ratones por grupo); ** $p \leq 0.001$ vs DG.

TESSARIA ABSINTHIOIDES EVITA LA PÉRDIDA DE LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA INTESTINAL EN RATONES APOE-KO ALIMENTADOS CON DIETA GRASA.

Para evaluar los efectos protectores de la administración de *Ta* sobre la integridad de la barrera intestinal, se midieron los niveles de expresión génica de Zónula Occludens 1 (ZO-1), una de las proteínas de unión estrecha presente en las células epiteliales intestinales. ZO-1 interactúa directamente con factores transmembrana y se sabe que organiza y regula la estructura de las uniones estrechas. Además, ZO-1 se desplaza entre el núcleo y la membrana plasmática y modula la permeabilidad paracelular. Los resultados muestran que la dieta grasa disminuye significativamente la expresión de ZO-1 en intestino de ratones ApoE-KO. Sin embargo, cuando los animales son tratados con las distintas concentraciones de *Ta* antes del inicio de la dieta grasa, se puede observar la prevención de la disminución de la expresión de ZO-1, siendo *Ta* 100% la concentración que logra valores similares al grupo de animales control (Figura 8). Estos resultados sugieren que *Ta* es capaz de evitar el aumento de la permeabilidad intestinal ocasionada por el consumo de dieta grasa.

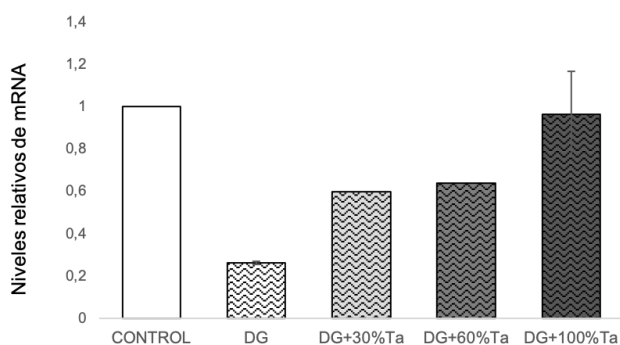


Figura 8. Efecto de *Ta* sobre la integridad de barrera intestinal en ratones ApoE-KO que consumieron dieta grasa (DG), o que recibieron un pre-tratamiento con una decocción de *Ta* al 30% (DG+30% *Ta*), al 60%

(DG+60%*Ta*) o al 100% (DG+100%*Ta*) durante 4 semanas. La expresión génica de ZO-1 fue medida por PCR a tiempo real.

TESSARIA ABSINTHIOIDES PREVIENE EL AUMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO CAUSADO POR LPS *IN VITRO*.

En orden de conocer el poder antioxidante de *Ta*, previamente demostrado en nuestro grupo [25], células de adenoma colorrectal humano (CaCo) fueron expuestas a diferentes concentraciones de *Ta* durante 30 minutos. Luego, se indujo daño a dichas células mediante lipopolisacárido (LPS) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) durante 1 hora (Figura 9). Los resultados demuestran que *Ta* es capaz de prevenir el aumento del estrés oxidativo provocado tanto por LPS como de TNF alfa, de forma dosis dependiente.

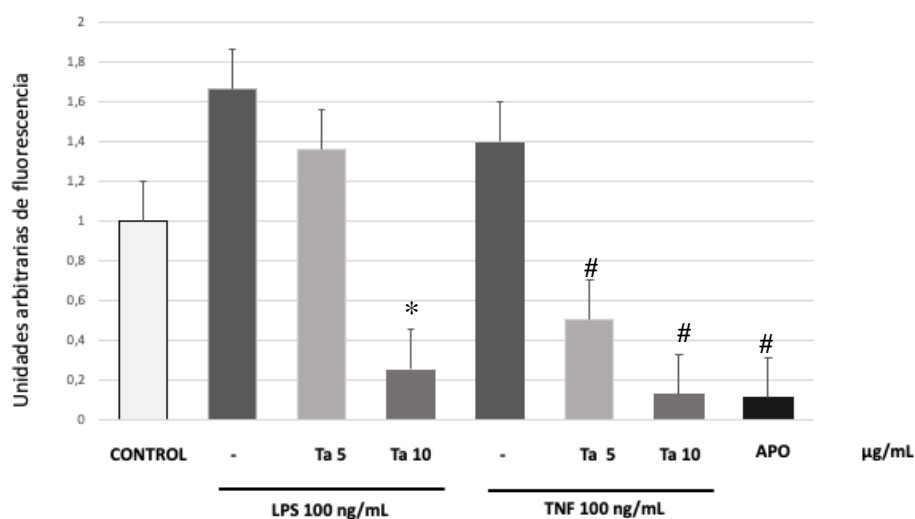


Figura 9. Efecto antioxidante de *Ta* sobre un cultivo de células CaCo tratadas con LPS o TNF alfa. APO: apocinina inhibidor de NADPH oxidasas, control positivo. Las especies reactivas de oxígeno fueron medidas a través de la sonda diclorofluoresceína CM-H2DCFDA. Los datos son medias \pm SEM; * $p \leq 0.001$ vs LPS; # $p \leq 0.05$ vs TNF.

DISCUSIÓN

Nuevas estrategias de prevención y tratamientos que reduzcan varios factores de riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular relacionados con el síndrome metabólico son sumamente necesarias, y en este contexto, el uso de plantas nativas podría ser beneficioso; sin embargo, esta estrategia merece un análisis en profundidad. Se han confirmado diferentes propiedades *Tessaria absinthioides* y sus beneficios para la salud (principalmente efectos antioxidantes, antimicrobianos, citotóxicos y antitumorales) a través de estudios *in vitro* e *in vivo* [15,16], pero sus efectos beneficiosos sobre la salud intestinal no han sido explorados en estudios *ex vivo* e *in vivo*. Este trabajo muestra efectos antioxidantes, antiinflamatorios y protectores de la función de barrera intestinal en modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Dados los resultados previos del grupo de investigación en cuanto al posible efecto protector de *Ta* del aumento de la permeabilidad intestinal inducida químicamente y que el primer punto de interacción de *Ta* en el organismo es el tracto gastrointestinal, se analizó la expresión de genes relacionados al estrés oxidativo como NOX2 y a la inflamación, como MCP-1. En esta primera aproximación pudimos observar que *Ta* es capaz de impedir el aumento de la inflamación y el estrés oxidativo provocado por LPS, un componente mayoritario de las membranas de las bacterias Gram negativas y que induce inflamación y aumento del estrés oxidativo. Las alteraciones en la barrera intestinal pueden dar lugar a la entrada de estas endotoxinas al torrente sanguíneo. El lípido A es un componente principal de LPS; activa mecanismos proinflamatorios e induce estrés oxidativo [26]. Este efecto protector también fue reportado con otros compuestos como quercetina [27], ácido gálico [28], 4-Octyl itaconate [29].

Si bien se tenía información acerca de los efectos antioxidantes de *Ta* que previamente habían sido reportados por el grupo de investigación [25], no se tenía información acerca si este efecto ocurriría también en células intestinales cultivadas *in vitro*. Es por este motivo que se valoró el poder antioxidante de *Ta* en células CaCo, estimuladas con dos inductores de inflamación como es LPS y TNF alfa. Los pre-tratamientos con *Ta* mostraron un

efecto antioxidante es estas células, tal y como había sido reportado en otros cultivos celulares como células musculares lisas [25].

En las etapas preclínicas, el uso de modelos animales es el enfoque predominante para probar nuevas terapias para la disfunción intestinal. Como hasta el momento no hay estudios sobre el impacto de *Ta* en la salud intestinal humana, los modelos *ex vivo* del intestino humano podrían ser una alternativa fisiológicamente más fiable a las líneas celulares humanas y una alternativa a la experimentación con animales en desarrollo preclínico.

Ya teniendo importantes datos que indicaban el efecto antioxidante y antiinflamatorio de *Ta*, se procedió a realizar una prueba piloto en un modelo animal que simulara un estado de síndrome metabólico. Para ello se utilizaron ratones ApoE-KO, espontáneamente hipercolesterolémicos, a los cuales se les administró una dieta grasa durante 6 semanas. El objetivo de esta prueba *in vivo* era provocar un estado de disfunción intestinal con una dieta obesogénica y no químicamente como lo habíamos hecho en los experimentos *ex vivo*. El siguiente objetivo era conocer cuál concentración de *Ta* sería la más efectiva en prevenir los efectos deletéreos de la dieta grasa como el aumento de inflamación, aumento de oxidación y pérdida de la permeabilidad intestinal. Para seguir el principio de las 3 R (reducir, reemplazar y refinar), utilizamos ratones ApoE-KO de descarte para realizar esta prueba piloto, con el fin de obtener información acerca de qué concentración de *Ta* utilizar en un protocolo experimental definitivo y de esta manera, reducir la cantidad de animales. Dada la disponibilidad de animales, de jaulas y mamaderas en el bioterio SPF de FCM UNCUYO, se decidió utilizar 2 ratones ApoE-KO machos de 5 meses de edad por grupo de experimentación. La justificación de la elección de ratones macho fue la disponibilidad de jaulas y que, al ser 2 animales por grupo, no podían ser separados ya que los ratones son una especie social y no pueden estar en solitario. El experimento definitivo se planea realizar con machos y hembras según disponibilidad de jaulas y mamaderas del bioterio. Al tratarse de una prueba piloto, como primera aproximación para comprobar si el modelo había funcionado y si *Ta* demostraba efectos benéficos, determinamos tres variables bioquímicas que podían mostrar el estado metabólico bioquímico de los animales. En el apartado de resultados se muestran los datos obtenidos de un ratón por grupo, ya que en algunos casos hubo hemólisis en el proceso de

extracción de sangre o errores inherentes a las técnicas bioquímicas. Esto significaba que no podíamos tomar decisiones en base a las pruebas bioquímicas, por lo que continuamos el análisis hacia la determinación de la peroxidación lipídica. Afortunadamente, los resultados obtenidos en la medición de TBARS fueron los esperados, encontrando que la dieta grasa provocaba un aumento de la peroxidación lipídica y las diferentes concentraciones de *Ta* prevenían dicho aumento en una forma dosis dependiente. Estos resultados sugerían que tanto las diluciones al 60 y 100% de *Ta* serían las más efectivas en disminuir los niveles de peroxidación lipídica producida por la ingesta de dieta grasa. Recientemente el grupo de investigación había probado los efectos antioxidantes de *Ta* sobre ratones ApoE-KO alimentados con dieta estándar [25].

La permeabilidad intestinal es un componente de la barrera intestinal. Esta barrera es una interfaz dinámica entre el cuerpo y los alimentos y los patógenos que ingresan al tracto gastrointestinal. Por lo tanto, los componentes de la dieta pueden afectar directamente esta interfaz, y muchos metabolitos producidos por las enzimas del huésped o la microbiota intestinal pueden actuar como moléculas señalizadoras o ejercer efectos directos sobre esta barrera. Existen diversos mecanismos que pueden conducir a los efectos de la dieta sobre la permeabilidad intestinal: alteraciones en la composición de la microbiota, expresión de proteínas de uniones estrechas y/o transportadoras de células epiteliales y canales iónicos, y activación de receptores cuando actúan factores dietéticos o sus metabolitos como ligandos o moléculas de señalización. Finalmente, para comprobar los efectos sobre la permeabilidad intestinal obtenidos en los experimentos *ex vivo* en explantes intestinales, analizamos la expresión génica de la proteína Zónula Occludens 1 (ZO-1). Nuestros resultados muestran que la dieta grasa disminuye la expresión de ZO-1 en intestino de ratones ApoE-KO. Pero los animales que previo al inicio de la dieta grasa consumieron las decocciones de *Ta*, previnieron el aumento de la permeabilidad intestinal al aumentar la expresión de ZO-1 en intestino. Estos resultados van en concordancia con efectos encontrados en la misma dirección de compuestos provenientes de plantas como son los polifenoles, flavanonas y antocianos[30, 31,32].

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo permite inferir que el efecto antiinflamatorio y antioxidante de *Ta* encontrado *ex vivo* e *in vitro*, se extrapola al modelo *in vivo* con lo cual *Ta* podría ser una interesante terapia nutricional para prevenir la disfunción intestinal relacionada al síndrome metabólico. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender completamente el mecanismo de acción molecular de *Tessaria absinthioides*, pero consideramos que nuestros hallazgos son un comienzo para dilucidar los efectos potenciales de estas plantas nativas.

CONCLUSIONES

En este trabajo un grupo de ratones ApoE-KO fueron alimentados con alimento estándar (grupo control), con un DG durante seis semanas (grupo DG) y se les dio decocciones de *Ta* en tres concentraciones diferentes: 30%, 60% y 100% (150, 300 y 450 mg/Kg/día, respectivamente) cuatro semanas antes de la DG (*Ta*30%+HFD; *Ta*60%+HFD; *Ta*100%+HFD, respectivamente). Luego de esto el objetivo de este estudio fue evaluar los posibles efectos antioxidantes y antiinflamatorios en explantes intestinales *ex vivo* y evaluar los efectos beneficiosos sobre los parámetros metabólicos, el estado oxidativo y la permeabilidad intestinal de tres dosis diferentes de decocciones de *Ta* en ratones ApoE-KO alimentados con una dieta alta en grasas (DG). Los resultados permitieron arribar a la siguiente conclusión:

- *Tessaria absinthioides* protege contra el aumento de la permeabilidad intestinal, previene la inflamación y el aumento del estrés oxidativo provocado químicamente en explantes intestinales *ex vivo*.
- *Tessaria absinthioides* posee efectos antioxidantes al prevenir el aumento de las especies reactivas del oxígeno provocadas por agentes proinflamatorios como LPS o TNF alfa en células intestinales humanas cultivadas *in vitro*.
- *Tessaria absinthioides* evita la peroxidación lipídica sistémica y mejora la expresión génica de la proteína de unión intestinal ZO-1 en un modelo de síndrome metabólico *in vivo*.

En conclusión, este estudio proporciona evidencia del efecto benéfico de *Tessaria absinthioides* sobre la inflamación y el estrés oxidativo presentes en la disfunción intestinal provocada químicamente *ex vivo* o inducida por una dieta obesogénica *in vivo*, así como también un efecto protector en la disfunción de la barrera intestinal, medida por su permeabilidad. Las propiedades protectoras de barrera, antiinflamatorias y antioxidantes de *Tessaria absinthioides* podrían emerger como un posible apoyo complementario a las terapias actuales para controlar la disfunción intestinal relacionada con la obesidad.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018 Feb 26;20(2): 12. doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- [2] Lahsen, R. Metabolic syndrome and diabetes. *Revista Médica Clínica Las Condes* Volume 25, Issue 1, January 2014, Pages 47-52. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70010-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70010-0).
- [3] Real, J.T.; Carmena, R. Relevance of metabolic syndrome and its definition depending on the criteria employed. *Med Clin (Barc).* 2005 Mar 19;124(10): 376-8. doi: 10.1157/13072572.
- [4] Malesza, I.J.; Malesza, M.; Walkowiak, J.; Mussin, N.; Walkowiak, D.; Aringazina, R.; Bartkowiak-Wieczorek, J.; and Madry, E. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. *Cells.* 2021 Nov 14;10(11):3164. doi: 10.3390/cells10113164.
- [5] Bradley, W.D.; Zwingelstein, C.; Rondinone, C.M. The emerging role of the intestine in metabolic diseases. *Arch Physiol Biochem.* 2011 Jul;117(3): 165-76. doi:10.3109/13813455.2011.578651.
- [6] Sanz, M.B. K.; Donadel, O.J.; Rossomando, P.C.; Tonn, C.E.; Guerreiro, E. Sesquiterpenes from *Tessaria absinthioides*. *Phytochemistry* 1997, 44, 897–900.
- [7] Barboza, G.E.; Cantero, J.J.; Núñez, C.; Pacciaroni, A.; Ariza Espinar, L. Medicinal plants: A general review, a phytochemical, and ethnopharmacological screening of the native Argentine flora. *Kurtziana* 2009, 34, 365.
- [8] Bailac, P.; Duschatzky, C.; Carrascull, A.; Ponzi, M. Composition of the Essential Oils of *Tessaria absinthioides* (Hook et Arn.) D. Candolle. *J. Essent. Oil Res.* 2013, 10, 89–91.
- [9] Campos-Navarro, R.; Scarpa, G.F. The cultural-bound disease “empacho” in Argentina. A comprehensive botanical-historical and ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 2013, 148, 349–360.
- [10] Madaleno, I.M.; Delatorre-Herrera, J. Popular medicine of Iquique, Tarapacá. *Idesia* 2013, 31, 67–78.
- [11] García, M.; Sosa, M.E.; Donadel, O.J.; Giordano, O.S.; Tonn, C.E. Effects of some sesquiterpenes on the stored-product insect *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 2003, 62, 17–26.
- [12] García, M.; Sosa, M.E.; Donadel, O.J.; Giordano, O.S.; Tonn, C.E. Allelochemical effects of eudesmane and eremophilane sesquiterpenes on *Tribolium castaneum* larvae. *J. Chemical Ecol.* 2003, 29, 175–187.
- [13] Donadel, O.J.; Guerrero, E.; María, A.O.; Wendel, G.; Enrize, R.D.; Giordano, O.S.; Tonn, C.E. Gastric cytoprotective activity of ilicic aldehyde: Structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 3547–3550.
- [14] Visintini, J.M.F.; Redko, F.; Muschiatti, L.V.; Campos, R.H.; Martino, V.S.; Cavallaro, L.V. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. *Virology* 2013, 27, 245.

- [15] Torres Carro, R.; Isla, M.I.; Ríos, J.L.; Giner, R.M.; Alberto, M.R. Anti-inflammatory properties of hydroalcoholic extracts of Argentine Puna plants. *Food Res. Int.* 2017, 67, 230–237.
- [16] Persia, F.A.; Rinaldini, E.; Carrión, A.; Hapon, M.B.; Gamarra-Luques, C. Evaluation of cytotoxic and antitumoral properties of *Tessariaabsinthioides* (Hook & Arn) DC, “pájaro bobo”, aqueous extract. *Medicina* 2017, 77, 283–290.
- [17] Rey, M.; Kruse, M.S.; Magrini-Huamán, R.N.; Gómez, J.; Simirgiotis, M.J.; Tapia, A.; Feresin, G.E.; Coirini, H. *Tessariaabsinthioides* (Hook. & Arn.) DC. (Asteraceae) Decoction Improves the Hypercholesterolemia and Alters the Expression of LXRs in Rat Liver and Hypothalamus. *Metabolites* 2021, 11, 579. <https://doi.org/10.3390/metabo11090579>.
- [18] Quesada, I.; De Paola, M.; Alvarez, M.S.; Hapon, M.B.; Gamarra-Luques, C.; Castro, C. Antioxidant and Anti-atherogenic Properties of *Prosopis strombulifera* and *Tessariaabsinthioides* Aqueous Extracts: Modulation of NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species. (2021) doi: 10.3389/fphys.2021.662833.
- [19] Gómez, J.; Simirgiotis, M.J.; Lima, B.; Gamarra-Luques, C.; Bórquez, J.; Caballero, D.; Egly Feresin, G.; Tapia, A. UHPLC–Q/Orbitrap/MS/MS Fingerprinting, Free Radical Scavenging, and Antimicrobial Activity of *Tessariaabsinthioides* (Hook. & Arn.) DC. (Asteraceae) Lyophilized Decoction from Argentina and Chile. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Nov 28; 8(12): 593. doi: 10.3390/antiox8120593.
- [20] Benavides, F.G.; Guénet, J.L. Los roedores de laboratorio como modelos de enfermedades humanas. *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones.* 2003. Universidad de Alcalá Laboratory Animals Ltd. SECAL.
- [21] Cannizzo, B.; Luján, A.; Estrella, N.; Lembo, C.; Cruzado, M.; Castro, C. Insulin Resistance Promotes Early Atherosclerosis via Increased Proinflammatory Proteins and Oxidative Stress in Fructose-Fed ApoE-KO Mice. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:941304. doi: 10.1155/2012/941304.
- [22] Piedrahita, J.A.; Zhang, S.H.; Hagaman, J.R.; Oliver, P.M.; Maeda, N. “Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 10, pp. 4471–4475, 1992. doi: 10.1073/pnas.89.10.4471.
- [23] Nakashima, Y.; Raines, E.W.; Plump, A.S.; Breslow, J.L.; Ross, R. “Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE deficient mouse”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 18, no. 5, pp. 842–851, 1998. doi: 10.1161/01.atv.18.5.842.
- [24] Rosenfeld, M.E. An overview of the evolution of the atherosclerotic plaque: from fatty streak to plaque rupture and thrombosis. *Z Kardiol.* 2000 Oct; 89(Suppl 7): VII2-VII6. doi: <10.1007/s003920070045.
- [25] Quesada, I.M et al. Antioxidant and Anti-atherogenic Properties of *Prosopis strombulifera* and *Tessariaabsinthioides* Aqueous Extracts: Modulation of NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species. *Front Physiol.* 2021 Jul 16; 12:662833. doi: 10.3389/fphys.2021.662833. eCollection 2021.

- [26] Boutagy, N.E.;McMillan, R.P.;Frisard,M.I.;Hulver, M.W. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie* 124: 11–20, 2016. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.020.
- [27]Sul, O.J.; Ra, S.W.Quercetin Prevents LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating NOX2/ROS/NF-κB in Lung Epithelial Cells.*Molecules*.2021 Nov17;26(22): 6949.doi: 10.3390/molecules26226949.
- [28]Tanaka, M.; Kishimoto, Y.;Sasaki, M.; Sato, A.;Kamiya, T.; Kondo, K.; Iida, K.Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. Extract and Gallic Acid Attenuate LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress via MAPK/NF-κB and Akt/AMPK/Nrf2 Pathways.*Oxid Med Cell Longev*.2018.doi: 10.1155/2018/9364364.
- [29] Li, Y.; Chen, X.; Zhang, H.; Xiao, J.; Yang, C.; Chen, W.; Wei, Z.; Chen, X.; Liu, J. 4-Octyl Itaconate Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation.*Drug Des Devel Ther*.2020 Dec 17; 14: 5547-5558.doi: 10.2147/DDDT.S280922.
- [30] Nunes, C.;Freitas, V.; Almeida, L.; Laranjinha, J.; Red wine extract preserves tight junctions in intestinal epithelial cells under inflammatory conditions: implications for intestinal inflammation. *Food Funct* 10: 1364–1374, 2019. doi: 10.1039/C8FO02469C.
- [31] Liu, L.;Liu, Z.; Li, H.; Cao, Z.; Li, W.; Song, Z.; Li, X.;Lu, A.;Lu, C.;Liu, Y. Naturally occurring TPE-CA maintains gut microbiota and bile acids homeostasis via FXR signaling modulation of the liver-gut axis. *Front Pharmacol* 11: 12, 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.00012.
- [32] Cremonini, E.;Daveri, E.;Mastaloudis, A.; Adamo, A.M.;Mills, D.;Kalanetra, K.; Hester, S.N.; Wood, S.M.;Fraga, C.G.;Oteiza, P.I. Anthocyanins protect the gastrointestinal tract from high fat diet-induced alterations in redox signaling, barrier integrity and dysbiosis.*Redox Biol*.2019.doi: 10.1016/j.redox.2019.101269.
- [33] Kashyap, V.S.; Santamarina-Fojo, S.; Brown, D.R.; Parrott, C.L.; Applebaum-Bowden, D.; Meyn, S.;Talley, G.;Paigen, B.;Maeda, N.;Brewer Jr,H.B. Apolipoprotein E Deficiency in Mice: GeneReplacement and Prevention of Atherosclerosis Using Adenovirus Vectors.*The Journal of Clinical Investigation, Inc*.Volume 96, September 1995, 1612-1620.doi: 10.1172/jci118200.