



Potencial inductor de neuroplasticidad estructural por parte de una fracción activa de *Tillandsia usneoides* y su perfil cromatográfico por UHPLC-DAD-QTOF-MS

Potential Induction of Structural Neuroplasticity by an Active Fraction of *Tillandsia usneoides* and Its Chromatographic Profile by UHPLC-DAD-QTOF-MS

Leonardo VILLARREAL ROMERO^{1,2*}, Maria Fernanda SÁNCHEZ RONCANCIO¹, Jhon SUTACHAN²,
Sonia Luz ALBARRACÍN², Geison MODESTI COSTA¹

¹Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, * wvillarreal@javeriana.edu.co

²Grupo de Investigación en Bioquímica Experimental y Computacional, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Presentación Poster 4

ABSTRACT

Chemotherapeutic drugs have been reported to cause toxicity in the Central Nervous System (neurotoxicity), decreasing neuroplasticity, which is the ability of the central nervous system to modify itself both structurally and functionally, leading to cognitive impairment [1-3]. However, there is currently no treatment effective enough to treat the loss of neuroplasticity, and its mechanisms are not fully elucidated. Previous work by our research groups indicated that one medicinal species that has been shown to have structural neuroplasticity-inducing activity in vitro is *Tillandsia usneoides*, which has been little studied both chemically and biologically. Considering the above, this study aimed to chemically characterize the active fraction ethyl acetate (AcOEt) and to evaluate its potential to induce neuritogenesis and the activation of Erk and PI3K pathways in cortical neurons of Wistar rat embryos. The plant material (leaves and stems of *T. usneoides*) was extracted by maceration with 96% ethanol and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator. The resulting extract was fractionated by vacuum chromatography with solvents of increasing polarity, which were subsequently analyzed by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) and Ultra High-Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector and Mass Spectrometry (UHPLC-DAD-QTOF-MS). UV detection was performed at 254 nm and 360 nm and MS detection was performed between 100 and 1000 m/z. In parallel, the structural neuroplasticity-inducing effect of ethanolic extract (EtOH) and ethyl acetate (AcOEt) and hydroethanolic (H₂O:EtOH) fractions on cortical neurons of 18-day-old Wistar rat embryos were evaluated by immunocytochemical assays quantifying different morphometric parameters. The activating potential of the signaling pathways was evaluated by western blot detection of p-Akt (of the PI3k pathway) and p-Erk proteins. The results obtained indicated that the EtOH



extract is rich in phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids, and triterpenes, while the AcOEt fraction concentrated most of the flavonoid-type metabolites. The compounds 5,7,4'-trihydroxy-3,6,3',5'-tetramethoxyflavone and 3,5,7,4'-tetrahydroxy-6,3',5'-trimethoxyflavone were tentatively identified. Regarding neuroplastic activity, an enhancing effect on the complexity of the dendritic tree in neurons was evidenced, mainly for the AcOEt fraction that increased the number of dendritic branches and the length of dendrites at concentrations between 0.03 to 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. As a conclusion, the results obtained so far highlight an important structural neuroplastic activity of the AcOEt fraction of *T. usneoides* leaves, which seems to be related to its richness in methoxylated-type flavonoids.

Key words:

Tillandsia usneoides, flavonoids, neuroplasticity, signaling pathways.

RESUMEN

Se ha reportado que los fármacos quimioterapéuticos provocan toxicidad en el Sistema Nervioso Central (neurotoxicidad), disminuyendo la neuroplasticidad, que es la capacidad del sistema nervioso central de modificarse tanto estructural como funcionalmente, lo que conlleva a un deterioro cognitivo ^[1-3]. Sin embargo, en la actualidad no hay un tratamiento lo suficientemente eficaz para tratar la pérdida de neuroplasticidad y sus mecanismos no están completamente elucidados. Trabajos previos de nuestros grupos de investigación indicaron que una especie medicinal que ha demostrado tener actividad inductora de neuroplasticidad estructural *in vitro* es *Tillandsia usneoides* que ha sido poco estudiada tanto química como biológicamente. Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue caracterizar químicamente la fracción activa acetato de etilo (AcOEt) y evaluar su potencial inductor de neuritogénesis y de la activación de las vías Erk y PI3K en neuronas corticales de embriones de rata Wistar. El material vegetal (hojas y tallos de *T. usneoides*) fue extraído por maceración con etanol 96% y concentrado a presión reducida en rotaevaporador. El extracto resultante fue fraccionado por cromatografía al vacío con solventes de polaridad creciente, las cuales fueron posteriormente analizadas por Cromatografía en Capa Delgada de Alta Resolución (HPTLC) y Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia acoplada a Detector de Arreglo de Diodos y Espectrometría de Masas (UHPLC-DAD-QTOF-MS). La detección UV se realizó a 254 nm y 360 nm y la detección MS se realizó entre 100 y 1000 m/z. En paralelo, se evaluó el efecto inductor de neuroplasticidad estructural del extracto etanólico (EtOH) y de las fracciones acetato de etilo (AcOEt) e hidroetanólica (H₂O:EtOH) en neuronas corticales de embriones de 18 días de ratas Wistar, mediante ensayos por inmunocitoquímica cuantificando diferentes parámetros morfométricos. El potencial activador de las vías de señalización se evaluó mediante la detección por Western Blot de las proteínas p-Akt (de la vía PI3k) y p-Erk. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto EtOH es rico en compuestos fenólicos, como flavonoides y ácidos fenólicos, y triterpenos, mientras que la fracción AcOEt concentró la mayoría de los metabolitos de tipo flavonoides. Se identificaron tentativamente los compuestos 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3',5'-tetrametoxiflavona y



3,5,7,4'-tetrahidroxi-6,3',5'-trimetoxiflavona. En cuanto a la actividad neuroplástica, se evidenció un efecto potenciador de la complejidad del árbol dendrítico en neuronas, principalmente para la fracción AcOEt que aumentó el número de ramificaciones dendríticas y la longitud de las dendritas a concentraciones entre 0,03 a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Como conclusión, los resultados obtenidos hasta el momento destacan una importante actividad neuroplástica estructural de la fracción AcOEt de las hojas de *T. usneoides*, la cual parece estar relacionada con su riqueza de flavonoides de tipo metoxilados.

Palabras clave:

Tillandsia usneoides, flavonoides, neuroplasticidad, vías de señalización

Agradecimientos/Acknowledgements

Los autores agradecen a la Pontificia Universidad Javeriana, al Ministerio de Ciencia y Tecnología, al Ministerio de Educación, al Ministerio de Industria, Comercio y Turismo, al ICETEX y a la convocatoria «Ecosistema Científico» (792-2017) (contrato No. FP44842-221-2018) financiada por el Banco Mundial. y a la Pontificia Universidad Javeriana, Vicerrectoría de Investigación, por la financiación; Proyecto de Apoyo a Tesis Doctoral (ID 2083).

The authors thank the Pontificia Universidad Javeriana, the Ministry of Science and Technology, the Ministry of Education, the Ministry of Industry, Business and Tourism, ICETEX and the call "Scientific Ecosystem" (792-2017) (contract No. FP44842-221-2018) financed by the World Bank. and the Pontifical Javeriana University, Vice-Rector's Office for Research, for funding; Doctoral Thesis Support Project (ID 2083).

Referencias/References

- [1] TANNOCK, I. F., *et al.* Cognitive Impairment Associated with Chemotherapy for Cancer: Report of a Workshop. *Journal of Clinical Oncology* **22**(11): 2233-2239. [DOI]
- [2] CICHON, N., *et al.* (2020). Flavonoids as a Natural Enhancer of Neuroplasticity—an Overview of the Mechanism of Neurorestorative Action. *Antioxidants* **9**(11): 1035. [DOI]
- [3] CITRI, A. y MALENKA, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**(1): 18-41. [DOI]