



## ARTÍCULO ORIGINAL

---

# EFFECTOS DEL EXTRACTO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* EN LA CRISTALIZACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO INDUCIDO IN VITRO

Rosa María Guillén Fretes, Patricia María Funes Torres, Regina Susana Barreto Romero, Sofía Berenice Casal Barchello, Mireya Fabiana Feijoo González, Lourdes Judith Paredes Medina, Andrea Jamile Ayala Espinoza

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

---

### RESUMEN.

**Introducción:** La yerba mate es una infusión muy popular producida y consumida en Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. Se procesa a partir de hojas y tallos de *Ilex paraguariensis*.

**Objetivo:** analizar los efectos del extracto de *Ilex paraguariensis* sobre la cristalización de ácido úrico en un modelo in vitro en presencia y ausencia del extracto de *Ilex paraguariensis*.

**Métodos:** Ensayo experimental de fase pre clínica en el que se evaluaron muestras pareadas determinando las variaciones registradas entre la medición basal a tiempo cero y a los 30 minutos de número de cristales, dimensiones y número de agregados formados. Los resultados fueron analizados empleando la prueba estadística de los rangos con signo de *Wilcoxon*.

**Resultados:** Los resultados del ensayo control mostraron un aumento del número, agregados y tamaño de los cristales. En el ensayo con extracto de *Ilex paraguariensis* a concentración al 10%, los resultados mostraron tendencia a la disminución del número de cristales y de sus dimensiones. En el caso de los agregados llama la atención la escasa formación o incluso la ausencia de agregados de cristales de ácido úrico.

**Conclusión:** Este estudio podría repetirse con más ensayos incluyendo otras concentraciones y presentaciones comerciales. Los resultados podrían ser indicadores de las posibles propiedades de la yerba mate para combatir la formación, el crecimiento y la agregación de cristales de ácido úrico y, por tanto, una herramienta interesante en el complemento del tratamiento de la litiasis úrica.

#### Autor corresponsal:

Andrea Ayala

jami.ayala777@gmail.com

#### Palabras clave:

*Ilex paraguariensis*.

Ácido úrico. Yerba mate.

Cristalización.

## ABSTRACT

**Background:** Yerba mate is a very popular infusion produced and consumed in Argentina, Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay. It is processed from leaves and stems of *Ilex paraguariensis*.

**Objective:** To analyze the effects of the extract of *Ilex paraguariensis* on the crystallization of uric acid in an in vitro model in the presence and absence of the extract of *Ilex paraguariensis*.

**Methods:** Experimental trial of pre-clinical phase in which paired samples were evaluated determining the variations registered between the basal measurement at time zero and at 30 minutes of number of crystals, dimensions and number of aggregates formed. The results were analyzed using the statistical test of the signed Wilcoxon ranges.

**Results:** The results of the control test showed an increase in the number, aggregates and size of the crystals. In the case of the test with *Ilex paraguariensis* extract at 10% concentration, the results showed a tendency to decrease in the number of crystals and in their dimensions. In the case of aggregates, it is striking, in comparison with the control tubes, the scarce formation or even the absence of aggregates of uric acid crystals

**Conclusion:** This study could be repeated with more trials including other concentrations and commercial presentations. The results could be indicators of the possible properties of yerba mate to combat the formation, growth and aggregation of uric acid crystals and, therefore, an interesting tool in complementing the treatment of uric lithiasis

### Keywords:

*Ilex paraguariensis*. Uric acid. Yerba mate Crystallization.

---

## INTRODUCCIÓN.

La urolitiasis es una de las más antiguas enfermedades conocidas. Es el tercer problema más común del tracto urinario, con un riesgo estimado de vida de 2-5% en Asia, 8-15% en Europa y América y alrededor de 20% en el Oriente Medio (1). La urolitiasis resulta ser un gran problema pues alcanza a afectar al 1-14% de la población dependiendo de la zona. (2)

Los cálculos de ácido úrico se forman cuando la orina posee un pH ácido y en condiciones de hiperuricosuria. La hiperuricosuria puede presentarse en personas con ingesta elevada de carne, pescados o mariscos y, por tanto, son más propensas a desarrollar este tipo de litiasis (3). Es importante resaltar que el pH de la orina es un factor determinante en la formación de los cálculos, por lo que cualquier alteración de este es de interés para la prevención de este tipo de litiasis. (4).

El consumo de infusión de *Ilex paraguariensis* (conocido popularmente como yerba mate), un arbusto de la familia *Aquifoliaceae*, está muy difundido en países como Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay (5).

Numerosos compuestos fitoquímicos activos de *I. paraguariensis* han sido identificados y al cual se le atribuye numerosos efectos beneficiosos para la salud (6). Sin embargo, se desconoce si posee algún efecto sobre el proceso de formación de los cristales de ácido úrico y, por tanto, es prioritario iniciar estudios que aborden la verificación de estos posibles efectos. El objetivo del trabajo fue analizar los efectos del extracto de la planta *Ilex paraguayensis* sobre la cristalización de ácido úrico inducida in vitro (7).

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Ensayo experimental de fase pre clínica. El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), San Lorenzo-Paraguay

### Preparación del extracto

Se empleó como material de partida para la preparación del extracto una presentación comercial de yerba mate de marca Indega, variedad Clásica, la cual no presenta otras hierbas naturales agregadas en su fórmula. El extracto se preparó empleando condiciones similares a las típicas de la infusión tradicional, es decir, se pesaron 5 gramos de yerba mate y se suspendieron en 100 mL de agua a 4 °C, dejando reposar por 15 minutos. Se procedió a procesos sucesivos de filtración con el objetivo de remover partículas sólidas, el primer filtrado se realizó con gasa estéril, posteriormente se hicieron dos filtrados sucesivos con papel de filtro Whatman, al final de lo cual se obtuvo una solución libre de partículas sólidas y con una concentración aproximada de 5% p/v.

El extracto fue examinado al microscopio para verificar la ausencia de partículas sólidas que pudiesen interferir en el proceso de identificación y contaje de cristales de ácido úrico.

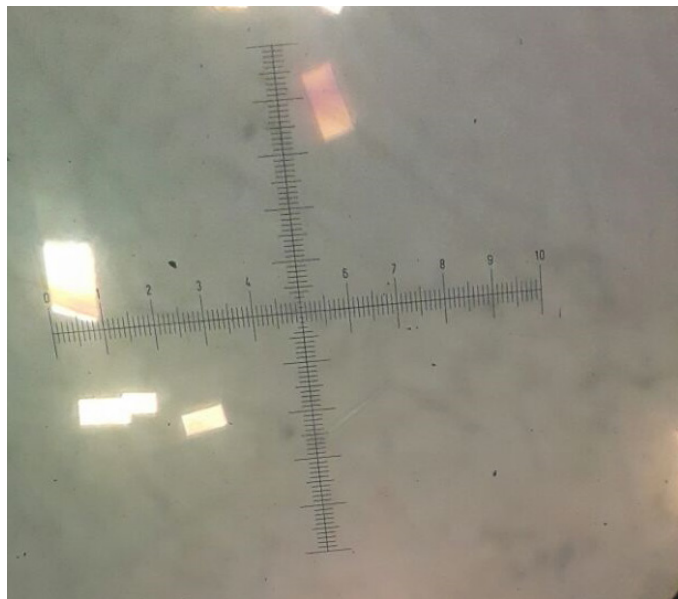
### Preparación de la orina sintética

Se preparó una solución de sales en concentraciones similares a las presentes en orina y que se denominó orina sintética, siguiendo condiciones descritas por Grases y colaboradores (8). La orina sintética se preparó mezclando 800 µL de la solución A y 800 µL de la solución B, cuyos componentes se detallan en la tabla 1, esto fue incubado a 37 °C. Además, se agregaron 400 µL de ácido úrico [2 g/L] y la solución resultante tiene un pH alcalino de forma a que la generación de los cristales de ácido úrico (**Figura 1**) estuviese inhibida hasta el momento del disparador del ensayo.

### Preparación de la solución control

La solución control fue preparada colocando partes iguales de la solución A y la solución B mostradas

en la tabla A. Fueron agregados 400 µl de ácido úrico [2 g/L] y preincubadas a 37 °C. (**Tabla 1**)



**Figura 1.** Vista microscópica de los cristales de ácido úrico en la orina sintética

Solución A	mM	Solución B	mM
MgSO4	5,98	NaH2PO4	15.45
NH4Cl	86,73	NaH2PO4. 12H2O	15.64
KCl	162,6	NaCl	223.08

**Tabla 1.** Concentraciones de los reactivos utilizados en el presente trabajo

### Ensayo de cristalización

El ensayo de cristalización se llevó a cabo por triplicado, tanto en los tubos control como en los tubos de experimento. En los tubos de control se adicionaron 200 µL de agua destilada estéril y en los tubos destinados a medir el efecto de la yerba se agregaron 200 µL del extracto de yerba mate. El disparador de la generación de cristales de ácido úrico incluyó la adición de 45 µL de HCl [1N] ajustando así el pH a 4,4, utilizando para la medición del pH tiras específicas con sensibilidad de un decimal de la marca Mackery y tipo Duotest con rango de pH 3,5-6,8.

Los tubos de ensayo fueron incubados a 37 °C en baño maría utilizando el equipo de marca Mem-

mert. Se colectaron muestras tanto de los controles como de los tubos de experimento a tiempo cero, es decir en el momento del agregado del ácido clorhídrico como disparador de reacción y a los 30 minutos de incubación. En ambos tiempos, tanto para los controles (n=3) y experimentos (n=3), se realizó el estudio de microscopía para el recuento y medición de cristales, número de agregados.

### Estudio microscópico

Los cristales fueron contados empleando el microscopio óptico con luz polarizada de marca IN SITU SA, utilizando la cámara de *Neubauer* y realizando el cálculo según procedimiento estandarizado. Se determinó el número y el tamaño de los cristales, así como el número de agregados. Los resultados fueron registrados en planillas diseñadas para el protocolo de estudio. El tamaño de los cristales se determinó empleando un micrómetro incluido en el ocular del microscopio y se midieron 10 cristales al azar en cada muestra analizada, tomando como medida el promedio obtenido de estas mediciones.

### Procedimiento estadístico

Los datos analizados corresponden a muestras pareadas ya que tanto en los controles como en los experimentos se determinaron las variaciones registradas entre la medición basal a tiempo cero y la medición final a tiempo 30 minutos. Por tanto, las diferencias que se registraron en estas variaciones son las que se desea determinar si son esta-

dísticamente significativas. Se utilizó estadística no paramétrica, empleando mediana como medida de tendencia central y debido a que el número de repeticiones es inferior a 30. Frente a lo expuesto la prueba estadística apropiada para el presente trabajo es la prueba de los rangos con signo de *Wilcoxon*. La prueba del signo de *Wilcoxon* se utiliza para muestras pareadas y no paramétricas; compara dos mediciones de rangos (medianas) y determina que la diferencia no se deba al azar, es decir, que la diferencia sea estadísticamente significativa (9).

Se consideró un intervalo de confianza del 95% y  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

### RESULTADOS.

Fueron realizadas dos lecturas por ensayo teniendo en cuenta los siguientes parámetros: número de cristales (por  $\mu\text{L}$ ), el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) y el número de agregados de cristales (por  $\mu\text{L}$ ): una lectura basal y una lectura a los 30 minutos. Cada ensayo tuvo un total de 3 repeticiones independientes (**Tabla 2**)

El sistema de generación del extracto con las filtraciones sucesivas permitió obtener un extracto libre de partículas sin interferir en la lectura de los resultados. El sistema de la orina sintética demostró carecer de cristales de ácido úrico en las condiciones de pH alcalino y fue óptimo en la formación de cristales de ácido úrico una vez iniciada la reacción con la adición del disparador de ácido clorhídrico que llevó el pH de la mezcla a 4,4.

	Número de cristales			Número de agregados			Tamaño de cristales		
	Basal	Final	Variación	Basal	Final	Variación	Basal	Final	Variación
Control 1	20	37	17	50	93	43	16	20	3
Control 1	2	17	15	5	43	38	12	25	13
Control 1	15	73	58	38	183	145	7	25	18
Mediana 1	15	37	17	38	93	43	12	25	13
Cuartil 1	9	27	16	21	68	40	10	22	8
Cuartil 3	18	55	38	44	138	94	14	25	16

**Tabla 2.** Resultados del ensayo control (cristalización en ausencia del extracto de *Ilex paraguariensis*) (n=3)

En presencia del extracto de la yerba mate, los resultados mostraron una tendencia a la disminución en el número de cristales y también en sus dimensiones. En el caso de los agregados, en comparación con los controles, la escasa formación agregados de cristales de ácido úrico (**Tabla 3**).

Si bien se observó una tendencia en la disminución de todos los parámetros medidos en presencia del extracto de la yerba mate frente a los controles, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,109$ ).

## DISCUSIÓN.

Se pueden destacar los siguientes aspectos, primero: el sistema de orina sintética y el esquema de ensayo in vitro funcionaron de forma óptima para evaluar la formación de los cristales de ácido úrico y, por tanto podrían emplearse a futuro en experimentos que evalúen otras condiciones de concentración del extracto de yerba mate o incluso compuestos totalmente diversos; en segundo lugar: los resultados observados son prometedores ya que se observó una tendencia a la disminución tanto en el número de cristales de ácido úrico, en sus dimensiones medias, así como en la casi nula formación de agregados en presencia del extracto de yerba mate. Resultados similares fueron observados en estudios que utilizaron plantas de especies distintas como Cola de caballo (*Equisetum arvense*) que refieren que el extracto acuoso de la hierba inhibe el crecimiento y número de cristales de ácido úrico (10).

Con el extracto al 10% P/V se observó una tendencia a la disminución tanto en el número y tamaño de cristales así como en el número de agregados. Si bien esta diferencia no es significativa, es probable que se deba al número de muestras pequeño y se utilizó una sola concentración de extracto. Estos resultados nos llevan a postular en un futuro próximo la repetición de estos experimentos, aumentando en número de duplicados y también probando concentraciones diversas del extracto acuoso que puedan permitir estudiar un posible efecto ligado a la dosis; se pueden asociar a componentes de la yerba mate como la teobromina cuyo efecto ya ha sido comprobado por grupos de investigación internacionales como un inhibidor de la formación de cristales de ácido úrico, descrito por Grases y colaboradores.

Debemos señalar como limitaciones del estudio, el número discreto de repeticiones realizadas tanto de los controles como de los experimentos con el extracto de yerba mate y que podrían estar ligadas a que el análisis de las variaciones registradas no haya sido estadísticamente significativo. Sin embargo, creemos que la ampliación del número de experimentos, así como pruebas con concentraciones diversas del extracto, o incluso la verificación de estos efectos con otras presentaciones comerciales de yerba mate podrían demostrar que el efecto y la tendencia observados se confirma.

	Número de cristales			Número de agregados			Tamaño de cristales		
	Basal	Final	Variación	Basal	Final	Variación	Basal	Final	Variación
Experimento 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Experimento 1	4	0	-4	10	0	-10	6	0	-6
Experimento 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mediana	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cuartil 1	0	0	-2	0	0	-5	0	0	-3
Cuartil 3	2	0	0	5	0	0	3	0	0

**Tabla 3.** Resultados del ensayo de cristalización en presencia del extracto de *Ilex paraguariensis* a concentración al 10% (P/V). (n=3)

## Conflicto de interés:

Los autores declaran no tener conflictos de interés

## Financiamiento:

Autofinanciado

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khan A, Bashir S, Khan SR, Gilani AH. Antiurolithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. *BMC Complement Altern Med*. 17 de octubre de 2011;11:96.
2. Félix Grases Freixedas ACV, Antonia Costa Bauzá MRB. Tipos de cálculos renales. Relación con la bioquímica urinaria. 2001. 1.
3. Piedras en los riñones | NIDDK [Internet]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. [citado 6 de mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-urologicas/piedras-rinones>
4. Archivos Españoles de Urología [Internet]. [citado 26 de mayo de 2017]. Disponible en: [http://aeurologia.com/articulo\\_prod.php?id\\_art=671814580763](http://aeurologia.com/articulo_prod.php?id_art=671814580763)
5. Burris KP, Harte FM, Michael Davidson P, Neal Stewart Jr C, Zivanovic S. Composición y Propiedades Bioactivas de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): Una Revisión. *Chil J Agric Res*. junio de 2012;72(2):268-75.
6. Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci*. noviembre de 2007;72(9):R138-151.
7. Claude Bennet, M.D. LG MD. CECIL, Tratado de Medicina Interna. 21.a ed. Vol. 1. Madrid, España: McGraw-Hill;
8. Grases F, Rodriguez A, Costa-Bauza A. Theobromine inhibits uric acid crystallization. A potential application in the treatment of uric acid nephrolithiasis. *PloS One*. 2014;9(10):e111184.
9. Gerardo López-Cruz, Ulises Reyes-Gomez, Pedro Hernández-Cruz. Proteína de Tamm-Horsfall: Implicaciones Clínicas en la Vía Urinaria.
10. Gallardo-Pérez JC, Esparza-Aguilar M de L, Gómez-Campos A. Importancia etnobotánica de una planta vascular sin semilla en México: *Equisetum*. *Polibotánica* [Internet]. 2006 [citado 6 de octubre de 2017];(21). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=62102103>