



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Veterinarias

Intoxicación por *Astragalus pehuenches*: caracterización clínica, bioquímica e histopatológica en cobayos y ovinos

Autor: Vet. Martinez, Agustín

Directores:

Dr. Gimeno, Eduardo Juan

Dr. Robles, Carlos Alejandro

Lugares de Trabajo:

Laboratorio de Patología “Dr. Bernardo Epstein”, FCV – UNLP

Grupo de Salud Animal, INTA Bariloche

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Miembros del jurado:

Prof. Dr. Verdes, José Manuel

Prof. Dr. Ayala, Miguel

Prof. Dr. Martín, Carlos

2015

Para el futuro, Bautista y Abril

AGRADECIMIENTOS

A Maria Macarena Bruno Galarraga compañera de trabajo y de la vida por el balance necesario en la dedicación familiar y profesional que me dio en estos años.

A mis familiares naturales y políticos y mis amigos por la paciencia que tuvieron en estos años de ausencias esporádicas y de caras de tesis.

A mis directores Carlos Robles y Eduardo Gimeno por los conocimientos, estimulación y apoyo que me ofrecieron en esta etapa de mi formación profesional y personal.

A mis compañeros del Grupo Salud Animal del INTA Bariloche por su constante y sincero acompañamiento en estos años.

A mis compañeros de Patología e Histología de la FCV de la UNLP por brindar un ambiente de trabajo muy cariñoso que me permitió transcurrir mi estadía de manera amena.

A Paula Rozenfeld y Lorena Cancelarich del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos de la UNLP por la apertura y dedicación en trabajar juntos en la caracterización bioquímica.

A Dale R. Gardner del PPRL de Utah por su desinteresada colaboración en los análisis toxicológicos.

A Mabel Marcantoni del Instituto Biológico Provincial de La Plata por el generoso aporte de los cobayos.

A Rocío Alvarez, Virginia Velasco, Nicolás Giovannini, Fernando Umaña, Laura Borrelli, Donald Bran, Priscilla Edwards y Héctor Arias del INTA Bariloche por los valiosos aportes y colaboración en la realización del trabajo.

A los diferentes organismos del Estado Nacional Argentino que han hecho posible, mediante la financiación de este trabajo, mi formación profesional: Beca de Formación de Posgrado INTA; Proyecto Específico 1115055 INTA “Enfermedades parasitarias, infecciosas y tóxicas de los Pequeños Rumiantes”; PICT 2011-1379 ANPCyT “Neuropatología veterinaria básica y aplicada en intoxicaciones inducidas por plantas tóxicas” y Proyecto de la Universidad Nacional de La Plata 11/V232 “Patología experimental en neuropatías inducidas por plantas tóxicas”.

Índice

Índice General	2
Índice de Tablas	5
Índice de Figuras	7
Abreviaturas	11
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUCCION.....	15
2 ANALISIS DE LA BIBLIOGRAFIA	17
2.1 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Astragalus spp.</i>	17
2.1.1 Características botánicas de <i>Astragalus pehuenches</i>	18
2.2 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DEL GÉNERO <i>Astragalus spp.</i>	18
2.2.1 Detección de swainsonina en otras especies vegetales	20
2.2.2 Relación entre endófitos y producción de swainsonina	21
2.2.3 Mecanismo de acción de la swainsonina.	21
2.3 ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LISOSOMAL.....	22
2.3.1 Intoxicación por swainsonina: α -manosidosis adquirida	23
2.3.2 Modelos animales para el estudio de las enfermedades de almacenamiento lisosomal	24
2.3.3 Casos espontáneos de α -manosidosis por consumo de <i>Astragalus pehuenches</i> en Argentina	25
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVOS	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28

3	CAPITULO I	29
	“DETERMINAR LA DISTRIBUCION Y EL POTENCIAL TOXIGÉNICO DE <i>Astragalus pehuenches</i> EN LA REGIÓN SUR DE LA PROVINCIA DE RÍO NEGRO”	29
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1.1	Recolección e identificación de <i>Astragalus pehuenches</i>	29
3.1.2	Análisis toxicológico en <i>Astragalus pehuenches</i>	31
3.1.3	Análisis estadístico de los resultados	31
3.2	RESULTADOS	32
3.2.1	Distribución y caracterización de <i>Astragalus pehuenches</i>	32
3.2.2	Potencial toxigénico de <i>Astragalus pehuenches</i> según zona geográfica	33
3.3	DISCUSION.....	35
4	CAPITULO II	37
	“CARACTERIZAR LA INTOXICACIÓN POR CONSUMO DE <i>Astragalus pehuenches</i> EN COBAYOS”	37
4.1	MATERIALES Y METODOS	37
4.1.1	Diseño experimental.....	37
4.1.2	Estudios clínicos	38
4.1.3	Estudios bioquímicos	39
4.1.4	Estudios patológicos	41
4.1.5	Análisis estadístico de los resultados	44
4.2	RESULTADOS	45
4.2.1	Hallazgos clínicos	45
4.2.2	Hallazgos bioquímicos	48
4.2.3	Hallazgos patológicos	51
4.3	DISCUSIÓN.....	66

5	CAPITULO III.....	72
	“CARACTERIZAR LA INTOXICACIÓN POR CONSUMO DE <i>Astragalus pehuenches</i> EN OVINOS”	72
5.1	MATERIALES Y METODOS	72
5.1.1	Diseño experimental.....	72
5.1.2	Estudios clínicos	73
5.1.3	Estudios bioquímicos	75
5.1.4	Estudios patológicos	76
5.1.5	Análisis estadístico de los resultados	78
5.2	RESULTADOS	79
5.2.1	Hallazgos clínicos	79
5.2.2	Hallazgos bioquímicos	81
5.2.3	Hallazgos patológicos	86
5.3	DISCUSIÓN.....	96
6	CONCLUSIONES FINALES	101
7	BIBLIOGRAFIA	103

Índice de Tablas

Tablas

1.1	Resultados toxicológicos de <i>Astragalus pehuenches</i> recolectados en los años 2012 y 2013 en las tres áreas de la provincia de Río Negro.....	33
1.2	Promedio y desvío estándar (\pm DE) de las concentraciones de swainsonina (SW) en especímenes de <i>Astragalus pehuenches</i> muestreados en cada sitio con sus coordenadas, correspondiente a la zona de cosecha.....	34
2.1	Lectinas empleadas con su nombre completo y acrónimos, especificando los carbohidratos a las cuales son afines.....	43
2.2	Promedios y desvío estándar (\pm DE) del consumo de pellets, ganancia de peso, dosis de swainsonina diarios, peso vivo inicial y final, en los dos grupos de cobayos.....	45
2.3	Valores promedios y desvío estándar (\pm DE) de los niveles de enzimas séricas evaluadas en el momento del sacrificio en ambos grupos experimentales.....	48
2.4	Promedio del grado de vacuolización citoplasmática observada en diferentes áreas del SNC para ambos grupos de cobayos.....	55
2.5	Promedio del grado de marcación de las lectinas. Se observan las diferencias en la marcación según área del SNC evaluadas para los dos grupos de cobayos.....	63
3.1	Lectinas empleadas sobre muestras de SNC con su nombre completo y acrónimos, especificando los carbohidratos a las cuales son afines.....	78
3.2	Evolución semanal del promedio del peso vivo y condición corporal y los desvío estándar correspondiente a cada variable (entre paréntesis) en ambos grupos del ensayo.....	80
3.3	Evolución semanal de la respuesta a la prueba de levantamiento de la cabeza en ambos grupos del ensayo.....	81
3.4	Valores promedio y desvío estándar (\pm DE) de los niveles de enzimas séricas evaluadas en ambos grupos experimentales de ovinos en cuatro momentos del ensayo.....	82
3.5	Intervalo de referencia (IR) para la actividad de la enzima α -manosidasa plasmática en ovinos.....	83

- 3.6** Promedio del grado de vacuolización citoplasmática observada en diferentes áreas del SNC para ambos grupos de ovinos.....**86**
- 3.7** Promedio del grado de marcación de las lectinas. Se observan las diferencias en la marcación según área del SNC evaluadas para los dos grupos de ovinos.....**95**

Índice de Figuras

Figura

- 1.1** Mapa de la provincia de Río Negro y sus áreas ecológicas, indicando con el recuadro negro el área donde se cosecharon los especímenes de *Astragalus pehuenches*.**27**
- 1.2** (A) Vista de un espécimen completo de *Astragalus pehuenches*; (B) Método de identificación de *Astragalus pehuenches* para el estudio sistemático de caracterización del potencial toxigénico; (C) Inflorescencia violácea; y (D) frutos globosos característicos de *Astragalus pehuenches*.....**32**
- 2.1** Evolución de la actividad exploratoria medido en la cantidad de cruces de cuadrantes, de los cobayos que consumieron *Astragalus pehuenches* (GT: barras negras), comparado con los cobayos controles (GC: barras grises).....**47**
- 2.2** Evolución del tiempo de inmovilidad medido en segundos, de los cobayos que consumieron *Astragalus pehuenches* (GT: barras negras), comparado con los cobayos controles (GC: barras grises).....**47**
- 2.3** Placa de cromatografía delgada de la orina de un cobayo del grupo tratado recolectada en el periodo de intoxicación experimental. El recuadro rojo marca la zona donde se observan las bandas correspondientes a OLG a partir del día 14.....**50**
- 2.4** Placa de cromatografía delgada de la orina de un cobayo del grupo control recolectada en el mismo periodo de intoxicación experimental. El recuadro rojo marca la zona donde debieran observarse las bandas correspondientes a los OLG.....**50**
- 2.5** Diferentes núcleos encefálicos. (A-B) Núcleo hipogloso; (C-D) Tálamo. (A y C) grupo control. (B y D) grupo tratado. Círculos negros: neuronas sanas; círculos rojos: neuronas con vacuolización.....**52**
- 2.6** (A) Neuronas grandes: α -neuronas (círculo negro) y pequeñas (flecha negra) de un cobayo del GC. Nótese la preservación de la sustancia de Nissl en las α -neuronas. (B) Diferentes grado y tipo de lesión: severa vacuolización en α -neuronas (círculo rojo) de un cobayo del GT, perdiendo por completo la observación de la sustancia de Nissl. Neuronas pequeñas con difusa vacuolización (flecha roja).....**53**
- 2.7** (A) Células de Purkinje en un cobayo del GC y (B) del GT. Nótese la moderada vacuolización y aumento del espesor del árbol dendrítico (flechas rojas). (C) Núcleo profundo del cerebelo en un cobayo del GC y (D) de GT. La severa vacuolización ocupa todo el citoplasma desplazando el núcleo hacia la periferia (círculo rojo). Flechas y círculo negro: neuronas sanas.....**54**
- 2.8** (A) Núcleo gracilis de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese los numerosos esferoides (flechas).....**55**

- 2.9** (A) Parénquima hepático de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese la vacuolización generalizada de los hepatocitos (flechas).....**56**
- 2.10** (A) Tejido renal de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese la vacuolización en células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y macula densa (flechas rojas).....**57**
- 2.11** (A) Glándulas uterinas de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese la vacuolización en células glandulares y en fibroblastos (círculo rojo). Círculo negro: glándula normal.....**57**
- 2.12** (A) Células de Purkinje un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Obsérvese la leve vacuolización citoplasmática (flechas rojas). Secciones semifinas incluidas en resina. Tinción azul de metileno.....**58**
- 2.13** (A) Epitelio endometrial de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Obsérvese la vacuolización citoplasmática en células epiteliales (flechas rojas). Secciones semifinas incluidas en resina. Tinción azul de metileno.....**59**
- 2.14** Célula de Purkinje de un cobayo del grupo tratado. Obsérvese la gran cantidad de vacuolas (V) citoplasmáticas de diversos tamaños y algunas con material granular en su interior. Tanto el núcleo (N) como las mitocondrias (M) se observan con su estructura normal. MET.....**58**
- 2.15** (A) Célula uterina del epitelio glandular de un cobayo del GC. Nótese la homogeneidad del citoplasma conteniendo escasos gránulos de secreción (flechas negras) y (B) de un cobayo del GT. Se aprecian vacuolas de membrana simple y con material granular electrodense en su interior, deformando el núcleo (flechas rojas)...**61**
- 2.16** (A) Médula oblonga de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión fuerte y homogénea para la lectina LCA en neuronas extrapiramidales (círculo rojo). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.....**62**
- 2.17** (A) Médula oblonga de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión fuerte para la lectina LCA continuando el contorno vacuolar en neuronas (círculo rojo). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.....**62**

- 2.18** (A, B y C) Cerebelo de un cobayo del GC y (D, E y F) un cobayo del GT. (D) La marcación de color marrón representa la reacción positiva para GFAP en astrocitos (flechas) de la sustancia blanca de la base del cerebelo, (E) y en la capa molecular y cercano a las células de Purkinje (flechas), revelando astrogliosis. (F) Focos de microgliosis en capa molecular con la marcación de color marrón representa fuerte reacción positiva a Iba-1 en microglía (flechas). (A, B, C) La marcación leve correspondiente a un nivel basal en cobayos del grupo control. IHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.....**64**
- 2.19** (A y B) Cerebelo de cobayo del grupo tratado. La marcación de color marrón pardo representa la reacción positiva para ubiquitina en un esferoide cortado transversalmente ubicado en la sustancia blanca de la base del cerebelo (asteriscos) y en axones dilatados cortados longitudinalmente (flechas rojas). IHQ. Método estreptavidina-biotina.....**65**
- 3.1** Actividad de la enzima α -manosidasa plasmática a lo largo del ensayo. La línea negra representa el promedio y desvío estándar (\pm DE) de los valores de actividad en los ovinos del GT. La línea gris representa el promedio y desvío estándar (\pm DE) de los valores de actividad en los ovinos del GC. La línea roja representa el límite inferior del intervalo de referencia calculado.....**84**
- 3.2** Placa de cromatografía delgada de la orina de un ovino del GT recolectada en el periodo de ensayo. El recuadro rojo marca la zona donde se observan las bandas correspondientes a OLG.....**85**
- 3.3** Placa de cromatografía delgada de la orina de un ovino del GC recolectada en el periodo de ensayo. El recuadro rojo marca la zona donde debieran observarse las bandas correspondientes a los OLG.....**85**
- 3.4** (A) Corteza cerebelar en un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese el cambio en la morfología de la capa molecular debido al aumento del espesor del árbol dendrítico (flechas)..... **87**
- 3.5** (A) Células de Purkinje de un ovino del GC y (B) de un ovino del GT, la severa vacuolización ocupa todo el citoplasma desplazando el núcleo hacia la periferia (circulo). (C) Núcleo reticular medular de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la severa vacuolización fina que ocupa gran parte del citoplasma y desplaza el núcleo hacia la periferia (flechas).....**88**
- 3.6** (A) Núcleo gracilis de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la presencia de numerosos esferoides axonales (flechas).....**89**
- 3.7** (A) Parénquima hepático de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la ausencia de alteraciones evidentes en los hepatocitos.....**89**

- 3.8** (A) Tejido renal de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Se observa moderada vacuolización en células epiteliales de los túbulos contorneados proximales (círculo rojo)**90**
- 3.9** (A) Glándulas uterinas de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la vacuolización en células glandulares (círculo rojo). Círculo negro: glándula normal..**91**
- 3.10** (A) Células de Purkinje y estrelladas con citoplasma homogéneo y normal de un ovino del GC. (B) Células de Purkinje con numerosas vacuolas citoplasmáticas (flechas) de un ovino del GT**91**
- 3.11** (A) Epitelio uterino de células cilíndricas con citoplasma homogéneo y secreción mucoide (flecha) en un ovino del GC. (B) Epitelio uterino con numerosas vacuolas citoplasmáticas en un ovino del GT**92**
- 3.12** (A) Célula de Purkinje de un ovino del GT y (B) astrocito de un ovino del GT. Obsérvese la gran cantidad de vacuolas (V) citoplasmáticas de diversos tamaños y algunas con material granular en su interior (flechas amarillas). Tanto el núcleo (N) como las mitocondrias (flechas rojas) se observan con su estructura normal. MET.....**93**
- 3.13** (A) Células de Purkinje de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión moderada para la lectina LCA (círculos rojos). En neuronas de un animal control no se observó marcación (círculos negros). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.....**94**
- 3.14** (A) Médula oblonga de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión fuerte para la lectina LCA en neuronas (círculos rojos). En neuronas de un animal control no se observó marcación (círculos negros). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.**94**

Abreviaturas

μl: Microlitros

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

cm: Centímetro

CPK: Creatina fosfoquinasa

DAB: Diaminobenzidina

DE: Desvío Estándar

EAL: Enfermedad de Almacenamiento Lisosomal

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

FCAyF: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

GC: Grupo Control

GFAP: Proteína glial fibrilar

GT: Grupo Tratado

H₂O₂: Peróxido de Hidrogeno

HE: Hematoxilina y Eosina

H-F-F: Hojas, Flores y Frutos

HPLC-MS: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Espectrometría de Masa

hs: Horas

Iba-1: Proteína adaptadora ionizante de molécula unión a calcio-1

IHQ: Inmunohistoquímica

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IR: Intervalo de Referencia

kg: Kilogramos

L: Lactosa

LCA: *Lens culinaris*

LHQ: Lectinhistoquímica

m: Metros

mg: Miligramos

mm: Milímetros

MS: Materia Seca

msnm: Metros sobre el nivel del mar

NaOH: Hidróxido de Sodio

nm: Nanómetros

°C: Grados Celsius

OLG: Oligosacáridos

PBS: Solución Buffer Fosfato

pH: Potencial de Hidrogeno

ppm: Parte por millón

PPRL: Poisonous Plants of Research Laboratory

R: Rafinosa

Se: Selenio

SNC: Sistema Nervioso Central

SW: Swainsonina

sWGA: succynil wheat germ agglutinin

T: Tallos

TLC: Cromatografía en capa fina

UI: Unidades Internacionales

UNLP: Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN. El presente trabajo de tesis tiene como finalidad evaluar el potencial toxigénico de la planta *Astragalus pehuenches* en la región sur de la Provincia de Río Negro, Argentina y caracterizar clínica, bioquímica e histopatológicamente la intoxicación producida en cobayos y ovinos. Se cosecharon 110 kg de *A. pehuenches* en establecimientos cercanos las localidades de Los Menucos, Maquinchao e Ingeniero Jacobacci, determinándose concentraciones del principio activo swainsonina de 0,070 % a 0,097% SW/MS. Con el material vegetal seco y molido suministrado a cobayos y ovinos durante 54 días se logró reproducir la intoxicación. Los principales hallazgos clínicos fueron la disminución en la actividad exploratoria en cobayos y una leve alteración en el paso en los ovinos. A nivel bioquímico en ambas especies se determinó una temprana excreción de oligosacáridos en orina y además se observó inhibición temporal de la α -manosidasa plasmática en ovinos. Histopatológicamente, en ambas especies la principal alteración observada fue la vacuolización citoplasmática en el sistema nervioso central (SNC), útero y riñón. Ultraestructuralmente, se determinó que la vacuolización correspondía a la dilatación de múltiples lisosomas, con simple membrana de tamaños variables entre 1 y 10 μ m. Mediante los estudios histoquímicos, se determinó que los lisosomas neuronales contenían material rico en manosa y N-acetil glucosamina, y que el SNC presentaba reacción microglial y astrocitaria. Como hallazgo novedoso se destacan las lesiones encontradas en útero, que podrían estar relacionadas con las fallas reproductivas citadas para este tipo de intoxicaciones. Mediante el análisis de los resultados toxicológicos, clínicos, bioquímicos y patológicos se confirma la acción tóxica de *Astragalus pehuenches* como planta inductora de una enfermedad de almacenamiento lisosomal.

Palabras claves: Patagonia Argentina; Ovinos; Intoxicación; *Astragalus pehuenches*; Swainsonina; Enfermedad de almacenamiento lisosomal.

ABSTRACT. The aim of this thesis was to assess the toxigenic potential of the weed *Astragalus pehuenches* (Leguminosae) in the southern region of Rio Negro Province of Argentina and to characterize clinical, biochemical and histopathological changes in guinea pigs and sheep. One hundred and ten kilograms of *A. pehuenches* were harvested in farms nearby Los Menucos, Maquinchao and Ingeniero Jacobacci towns. Swainsonine concentrations between 0.070% and 0.097% SW/DM were detected in *A. pehuenches* populations in the study area. The disease was reproduced in guinea pigs and sheep by feeding them with dried and ground plant material during 54 days. The main clinical findings noted were a decrease in the exploratory activity of guinea pigs and a slight alteration in sheep pace. Biochemically, early excretion of urinary oligosaccharides was determined in both species and temporary inhibition of plasmatic α -mannosidase was observed in sheep. Histopathological changes such as cytoplasmic vacuolization in the central nervous system (CNS), uterus and kidney were observed in both species. Ultrastructurally, multiple dilatation of lysosomes with single membrane between 1 and 10 μ m in size was observed. Histochemically, accumulated material rich in mannose and N-acetyl glucosamine within neuronal lysosomes was observed and in the CNS presented microglial and astrocytic reaction. Lesions in the uterus are reported for the first time, and it is concluded that they may have implications on reproductive failures described elsewhere for this type of poisoning. This study confirms that *Astragalus pehuenches* intoxication, induced a lysosomal storage disease, as determined by toxicological, clinical, biochemical and pathological findings.

Keywords: Patagonia Argentina; Sheep; Poisoning; *Astragalus pehuenches*; Swainsonine; Lysosomal storage disease.

1 INTRODUCCION

En la región Patagónica, la producción ganadera se caracteriza por ser de cría extensiva y es realizada sobre pastizales naturales distribuidos en una gran variedad de ecosistemas. Las principales producciones pecuarias son la ovina, caprina y bovina, siendo la primera la de mayor stock animal y ocupación geográfica. La capacidad de carga animal de los establecimientos varía entre 0,5 a 0,1 UGO*/ha, necesitando de ese modo entre 2 y 10 hectáreas por UGO por año (Villagra y col, 2008). El sistema productivo está estrechamente relacionado con el ambiente que caracteriza la región Patagónica, por poseer esta una importante heterogeneidad natural que está dada principalmente por dos gradientes climáticos: el de precipitación que desciende de 2600 mm/año en el extremo Oeste (promedio últimos 10 años en Puerto Blest) a 156 mm/año en el extremo Este (promedio últimos 10 años en El Caín); y el de temperaturas que oscilan en promedio entre 0,8°C en invierno y 16,2°C en verano. La interrelación de elementos del medio natural como el relieve, clima, hidrografía y el bioma imprimen en una superficie determinada, lo que se denomina área ecológica (Bran y col, 2000). La vegetación de los pastizales naturales ubicados en estas áreas, está caracterizada por el predominio de estepas arbustivo-graminosas. Del universo de las especies vegetales que conforman estos pastizales naturales existen aquellas de alto valor forrajero, otras sin importancia forrajera y algunas indicadas como tóxicas.

A través de recopilaciones realizadas desde la época de la Campaña del Desierto en 1833 hasta la fecha, existe un listado de especies autóctonas o naturalizadas que fueron involucradas con algún grado de toxicidad, siendo la mayoría identificada por los pobladores rurales. Algunas

* UGO: Unidad Ganadera Ovina: equivalencias adaptadas a la zona que tiene como unidad los requerimientos de un capón de raza Merino de 40kg de peso vivo.

de las especies nombradas en los listados son: *Colliguaja integerrima*, *Poa huecu*, *Festuca argentina*, *Hipericum perforatum*, *Senecio filaginoides*, *Ovidia andina*, *Stilingia patagonica*, *Astragalus illini*, *Astragalus pehuenches*, etc. Sin embargo, son escasas las que han sido caracterizadas toxicológicamente (Ragonese, 1975).

Particularmente, sobre *Astragalus pehuenches* se ha generado información preliminar, ya que desde principios del siglo pasado se reportan casos de intoxicación en animales. Sin embargo, el único trabajo publicado es un caso natural ocurrido en la Provincia de Río Negro, donde se observó un brote que afectó al 73% de una majada de 300 ovejas madres (Robles y col 2000). En la década anterior había sido corroborada la presencia y concentración de un tóxico en dos ejemplares de herbario provenientes de las provincias de Mendoza y Chubut (Molyneux y Gómez-Sosa, 1991).

Pese a estos antecedentes, previo a este trabajo no fueron realizados estudios sistemáticos para conocer el potencial toxigénico de la planta en la región y no se realizó ningún intento de reproducción experimental de la intoxicación.

En este sentido, se plantea realizar el presente trabajo de tesis donde se evaluará el potencial toxigénico de *Astragalus pehuenches* en la región sur de la Provincia de Río Negro y se tratará de reproducir la enfermedad en animales en ensayos controlados mediante el suministro de la planta.

2 ANALISIS DE LA BIBLIOGRAFIA

2.1 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Astragalus* spp.

El género *Astragalus* es el más numeroso dentro de la familia de las Leguminosas y se encuentra ampliamente distribuido en el mundo. Se han identificado más de 2500 especies en todos los continentes, excepto Oceanía y Antártida (Gómez-Sosa, 1979; CPVCS, 2014). En América del Sur, éste género se ubica desde Ecuador hasta la zona Austral de Argentina y Chile, totalizando 110 especies descritas (Gómez-Sosa, 1979; 2010). Scherson y col (2008) a través de un estudio filogenético determinaron la presencia de dos orígenes de *Astragalus*, uno del viejo mundo representado por especies Euroasiáticas y otro, denominado Neo-*Astragalus* que habitan en el continente Americano. Este último se subdivide a su vez en dos clados denominados *G* y *F* (Scherson y col, 2008) siendo las principales características que los diferencian la distribución geográfica en el continente y la altura de los lugares donde se encuentran. Por ejemplo, las especies del *clado G* se concentran en áreas centrales de Chile y Argentina y no se hallan en relieves con grandes elevaciones sobre el nivel del mar; en cambio las especies del *clado F*, se encuentran distribuidas a lo largo del cordón andino en relieves elevados (Scherson y col, 2008). El género *Astragalus* está representado en Argentina por 70 especies endémicas tanto del *clado F* que se distribuyen principalmente sobre el oeste del país desde la provincia de Jujuy hasta Tierra del Fuego y especies pertenecientes al *clado G* las cuales se distribuyen hacia el centro-este encontrándose en la provincias de Río Negro, Córdoba y San Luis (Gómez-Sosa, 1979; Scherson y col, 2008; CPVCS, 2014). En la Patagonia se han descrito 28 especies de *Astragalus* spp, siendo una de ellas el *Astragalus pehuenches* (CPVCS, 2014).

2.1.1 Características botánicas de *Astragalus pehuenches*

Astragalus pehuenches (vulgarmente denominado *Garbancillo* o *Yerba Loca*) fue estudiado en su descripción botánica (Gómez-Sosa y col, 1979), presencia de tóxico (Molyneux y Gómez-Sosa, 1991) y como responsable de intoxicación espontánea en ovinos (Robles y col, 2000).

Las características morfológicas del *Astragalus pehuenches* pueden resumirse como: especie leguminosa herbácea de tamaño entre 10 y 45 cm de altura, ramosa desde la base con tallos fistulosos glabrescentes. Hojas de 5 a 9 mm de longitud y peciolo glabro. Pedúnculos largos con 6 a 8 flores de tamaño regular (6 a 10 mm de longitud) de color violáceo azulado. Legumbre inflada globosa puntiaguda en sus extremos, con tabique sublocular conteniendo entre 12 y 14 semillas negras (Gómez-Sosa, 1979).

Esta especie se ha detectado en la provincia de Mendoza, atravesando el este de Neuquén, centro sur de Río Negro y centro norte de Chubut (Gómez-Sosa, 1984). Pertenece al *clado G* de los *Neo-Astragalus* y crece en relieves entre los 800 y 1200 msnm, en suelos franco arenosos, en forma de manchones o isletas siguiendo una distribución conforme al escurrimiento del agua de lluvia, siendo similar su comportamiento al de otras especies de *Astragalus* (Melgoza Castillo y col, 2003; Scherson y col, 2008).

2.2 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DEL GÉNERO *Astragalus spp.*

Las especies se clasifican según su principio tóxico en cuatro grupos: a) acumuladoras de selenio; b) con presencia de compuestos nitro alifáticos; c) con presencia de un alcaloide indolizidínico; y aquellas sin toxicidad registrada hasta el presente (Gardner y col, 2001):

a) *Acumuladoras de selenio.*

Si bien la mayoría de las especies de *Astragalus* pueden desarrollarse en suelos con altas concentraciones de selenio, la acumulación de este mineral ocurre en escasas especies como *Astragalus flavus* y *Astragalus racemosus*. Estas especies son denominadas plantas indicadoras y pueden acumular hasta 3000 ppm de Se/kgMS. (Salisbury y Ross, 2000). Las especies que pueden crecer en suelos con selenio pero no acumulan el mineral son denominadas facultativas, y suelen tener concentraciones de 50 ppm de Se/kgMS. Plantas que poseen tan solo 5 ppm de Se/kgMS pueden ser tóxicas para los bovinos (Jubb y Kennedy, 2007). En Argentina, si bien hay relatos de productores, no se han encontrado especies acumuladoras de selenio y no se registra ningún caso natural de intoxicación (Sager y col, 1985; Williams y Gómez-Sosa, 1986; Molyneux y Gómez-Sosa, 1991).

b) *Con presencia de compuestos nitro alifáticos.*

Se estima que más de la mitad de las especies de *Astragalus* poseen algún compuesto nitro alifático en forma de b-D-glucósido, 3-nitro-1-propanol, miserotoxina y ácido 3-nitropropiónico (Williams, 1981). Los rumiantes son altamente susceptibles a este grupo tóxico, debido a la rápida biotransformación en rumen de cualquier compuesto nitro alifático a 3-nitro-1-propanol (Galey, 2010). En los años '80, en Argentina se determinó que 27 de 30 especies evaluadas contenían algún tipo de compuesto nitro alifático, como el caso de *Astragalus bergii*, *Astragalus distinens* y *Astragalus vesiculosus* (Sager, 1985; Williams y Gómez-Sosa, 1986).

c) *Con presencia de un alcaloide indolizidínico.*

El principal síndrome estudiado en *Astragalus* es el causado por el consumo prolongado de especies que contienen un alcaloide indolizidínico denominado swainsonina (SW) (Molyneux y col, 1994; Cook y col, 2011; Chenchen y col, 2014). Para considerar tóxica a una especie de

Astragalus spp. debe tener al menos 0,001% SW/MS. *Astragalus pehuenches* es una de las especies, y hasta la realización del presente trabajo, única en Argentina en la que se ha determinado la presencia y concentración de SW en especímenes de colección de herbario (Molyneux y Gómez-Sosa, 1991).

2.2.1 Detección de swainsonina en otras especies vegetales

En Norteamérica, en algunas especies del género *Oxytropis* también se encontraron concentraciones tóxicas de swainsonina, que junto con *Astragalus* son vulgarmente llamadas locoweeds (Marsh, 1909). En forma contemporánea a la profundización de los estudios de estos géneros en Estados Unidos, una planta difundida en Australia comenzaba a ser investigada por inducir signos clínicos similares que los reportados por los *locoweeds*. De la planta australiana llamada *Swainsona canescens*, se purificó por primera vez el alcaloide indolizídínico denominado swainsonina (Colegate y col, 1979).

Posteriormente otros géneros de plantas involucrados en casos naturales y sospechados de producir un cuadro similar a lo descrito en *locoweeds* y *Swainsona spp.*, fueron estudiados con el fin de determinar la presencia de SW entre sus principios tóxicos. Es así que en el año 1999 se identificó la presencia del alcaloide en *Ipomoea carnea* en Mozambique (de Balogh y col, 1999) y años más tarde en Brasil (Haraguchi y col, 2003). Además también en Brasil fueron identificadas en *Sida carpinifolia* (Driemeier y col, 2000) y *Turbina cordata* (Dantas y col, 2007) que hasta ese momento eran las únicas especies de esos géneros que contenían cantidades tóxicas de SW. Recientemente en Argentina se confirmó la presencia de SW en *Sida variegata* (Micheloud y col, 2015).

2.2.2 Relación entre endófitos y producción de swainsonina

En el año 2003, en especies norteamericanas de *Astragalus* y *Oxytropis*, se aisló un endófito relacionado al género *Embellisia* spp. que al ser cultivado permitió determinar su capacidad de producir SW. Además, se corroboró esta relación demostrando de que en especies de *Astragalus* sin swainsonina no se lograba el aislamiento del endófito (Braun y col, 2003). Luego se correlacionó la presencia del endófito, reclasificado como *Undifilum* spp, con la concentración *in vivo* de SW en dos genotipos de *locoweeds* (Pryor y col, 2009; Yu y col, 2010; Cook y col, 2011). En el 2013, se describe el aislamiento de *Undifilum* spp en ejemplares de *Swainsona canescens* y su implicancia en la producción de SW fue nuevamente comprobada (Grum y col, 2013). Por otra parte, se determinó que un endófito de la familia Ascomiceta crece en forma simbiótica en plantas de *Ipomea carnea* y también es responsable de producir el alcaloide (Cook y col, 2013). Cook (comunicación personal, 2015) hipotetiza que existiría una estrecha relación entre la presencia de endófito que produce swainsonina y la clasificación de los dos clados *F* y *G* descritos por Scherson y col (2008).

2.2.3 Mecanismo de acción de la swainsonina.

Como se mencionó anteriormente la SW es un alcaloide indolizidínico, potente inhibidor reversible de enzimas que intervienen en el metabolismo celular de las glicoproteínas. Esta inhibición se debe a que la molécula de SW es estructuralmente similar a la manosa, teniendo la SW mayor afinidad para unirse con las enzimas manosidasas (Dorling y col, 1980). Las primeras investigaciones proponían que su mecanismo de acción se acotaba a la inhibición de enzimas ubicadas en lisosomas, precisamente la α -manosidasa (Dorling y col, 1980). Sin embargo, años

más tarde se determinó que su potencial inhibidor involucra también a otras dos enzimas, la asociada al Complejo de Golgi o α -manosidasa II, y la α -manosidasa citosólica, aunque en este último caso su acción sería de menor potencia (Tulsiani y col, 1982; Winchester, 2005). Además y como acción indirecta cuando la molécula de SW entra al lisosoma, eleva el pH lisosomal reduciendo la actividad de otras enzimas (Tulsiani y Touster, 1983).

La inhibición por parte de la SW de las enzimas lisosomales produce en el animal una alteración que se engloba en las denominadas enfermedades de almacenamiento lisosomal (Jolly y Walkley, 1997).

2.3 ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LISOSOMAL

En medicina humana, se han descrito 45 enfermedades de almacenamiento lisosomal (EAL) siendo todas de origen genético y con baja prevalencia mundial, que dependiendo del país varía entre 1:750.000 y 1:1.000.000 (Meikle y col, 1999; Aucclair y col 2007). En medicina veterinaria, se han descrito 15 enfermedades de almacenamiento lisosomal. Por su relativa alta prevalencia e importancia económica, la α -manosidosis es la principal EAL en medicina veterinaria presentándose en sus dos variantes: genética y adquirida (Jolly y Walkley 1997).

La α -manosidosis genética se ha diagnosticado en bovinos, felinos y cobayos (Jolly, 1971; Blakemore, 1986; Crawley y col, 1999). En los años '70, en Australia y Nueva Zelanda se diagnosticó por primera vez esta enfermedad en bovinos de las razas Angus y Murray Grey llegando a una prevalencia del 10% del rodeo nacional (Jolly, 1978). Luego de la implementación de un plan de detección y eliminación de los heterocigotos, se logró disminuir su prevalencia (Jolly, 1978). En herbívoros, la α -manosidosis adquirida se debe al consumo prolongado de

plantas que poseen SW. Esta enfermedad se ha diagnosticado en países donde la producción pecuaria es importante como Australia (Law y Anson, 1968), Estados Unidos (James y col, 1970), Mozambique (de Balogh y col, 1999), Brasil (Driemeier y col, 2000), Argentina (Robles y col, 2000) y China (Takeda y col, 2014).

Si bien los dos tipos de α -manosidosis parecerían similares en su clínica y patología, existen diferencias desde su fisiopatogenia (Jolly y Walkley, 1997). En el caso de la α -manosidosis genética, existe una alteración en la codificación de una única enzima, la α -manosidasa lisosomal. Debido a esta disfunción enzimática no se metabolizan correctamente las glicoproteínas, por lo cual comienzan a acumularse residuos dentro de los lisosomas, llevando a una dilatación de estas organelas que provocan una distorsión en la arquitectura y funcionalidad celular. En el caso de la α -manosidosis adquirida la etiología comprende la inhibición, no sólo de la enzima lisosomal, sino además de las enzimas asociadas al complejo de Golgi y la citosólica. Esto determina que, además de la acumulación de residuos no metabolizados de glicoproteínas en los lisosomas, existe una alteración en la formación de las glicoproteínas estructurales de la célula lo que complejiza la fisiopatología (Winchester, 2005).

2.3.1 Intoxicación por swainsonina: α -manosidosis adquirida

Desde que se han tenido sospechas de la etiología de la enfermedad en los años 1870, se tuvo como objetivo la reproducción de la intoxicación en las especies susceptibles. Los primeros trabajos sobre intoxicaciones experimentales se realizaron en bovinos que pastoreaban *ad libitum* potreros donde predominaba *Astragalus lentiginosus* (Marsh, 1909). Previo a la purificación de SW en la especie australiana *Swainsona spp*, se utilizaron ovinos en diversos trabajos realizados

en las décadas del '60-70. Muchos de estos trabajos comparaban el cuadro de “*locoismo*” (intoxicación por especies de *locoweeds* americanas) y el “*pea struck*” (intoxicación por especies de *Swainsona* australianas). Es así que se realizaron reproducciones experimentales para determinar los efectos del consumo de las plantas a nivel general (van Kampen y James, 1969) reproductivo (van Kampen y James, 1971; James y col, 1972; 1975), teratogénico, del sistema nervioso (Law y Anson, 1968), comportamiento (Ralphs y col, 1990), etc.

Casos naturales de la intoxicación han sido reportados en ovinos (Robles y col, 2000), caprinos (Takeda y col, 2014), bovinos (Furlan y col, 2009), ciervos (Pedroso y col, 2009) y equinos (Harries y col, 1972; Loretto y col, 2003) teniendo en común la sintomatología caracterizada por un cuadro atáxico. Además se reportan trastornos reproductivos como abortos o nacimientos de crías con contractura de los miembros, y disminución progresiva de la condición corporal hasta llegar a un estado caquético.

2.3.2 Modelos animales para el estudio de las enfermedades de almacenamiento lisosomal

De forma general, los modelos animales han sido históricamente utilizados para reproducir experimentalmente aquellas enfermedades de importancia en medicina humana y en forma más reciente, en medicina veterinaria (Nishida, 2014).

Obtener un modelo animal que permita reproducir una enfermedad para ser estudiada, permite simplificar el manejo experimental, abaratar costos y reemplazar especies de mayor por otras de menor grado en la escala evolutiva; cumpliendo así con uno de los ítems del “Principio de las tres R’s (*Reducción, Refinamiento y Reemplazo*)” propuesto por Russel y Burch (1959).

Sin ser una excepción, la α -manosidosis adquirida ha habido un sinnúmero de intentos para determinar un modelo animal apropiado. Es así que a finales de la década de los '60, se realizaron los primeros trabajos fueron realizados en cobayos alimentados con *Swainsona galegifolia* molida, obteniendo excelentes resultados histopatológicos (Huxtable, 1969). Décadas más tarde, se realizaron estudios experimentales con diferentes extractos de *Ipomoea carnea* en ratas (Hueza y col 2005) y ratones (Stegelmeier y col, 2008) y *Oxytropis serioopetala* en conejos (Li y col 2012), obteniendo resultados dispares en cuanto al éxito en la reproducción de la intoxicación. En los últimos años, se utilizó y propuso nuevamente al cobayo como modelo para reproducir la intoxicación por consumo de *Ipomoea carnea* (Cholich y col 2009, Cholich y col 2013). La ventaja del modelo cobayo es que reproduce las lesiones a nivel del SNC, a bajas dosis y utilizando planta entera bajo un protocolo de intoxicación a través del consumo voluntario de la planta sin tener la necesidad de dosificar con SW purificada (Hueza y col 2005; Stegelmeier y col, 2008; Cholich y col 2009).

2.3.3 Casos espontáneos de α -manosidosis por consumo de *Astragalus pehuenches* en Argentina

Existen reportes de principio de siglo pasado donde describen intoxicaciones por consumo de *Astragalus pehuenches* en animales de producción en la provincia de Chubut. En estos primeros informes se describía que los animales que consumían el garbancillo desarrollaban alteraciones en el comportamiento, caminaban tambaleando y tenían movimientos anormales de la cabeza, incluso los animales se los conocían como *huecú* (en lengua mapuche significa:

borracho) (Kauffer y Heinken, 1984) tal vez confundiéndose con la sintomatología similar ocurrida en intoxicaciones por consumo de plantas de *Poa huecu* y/o *Festuca argentina*.

En el año 2000 se reportó el primer brote de intoxicación espontánea en un establecimiento de 300 ovinos aledaños a Maquinchao, Provincia de Río Negro. En este brote 220 animales murieron luego de presentar sintomatología nerviosa: ataxia, caminar envarado, se chocaban los alambrados, caían en decúbito y morían. Mediante el estudio microhistológico del contenido ruminal se determinó el consumo reciente de *Astragalus pehuenches*. El estudio histopatológico demostró marcada vacuolización de neuronas del sistema nervioso central en general y las células de Purkinje en particular (Robles y col, 2000).

HIPOTESIS

De la revisión bibliográfica se concluye que no existen estudios sistemáticos que hayan evaluado el potencial toxigénico de *Astragalus pehuenches* en la Argentina. Tampoco se han realizado ensayos que intenten reproducir experimentalmente la intoxicación en animales suministrando la planta.

Teniendo en cuenta que la reproducción experimental de la intoxicación es condición *sine qua non* para confirmar la presunción tóxica de una especie vegetal (Tokarnia y col, 2012), se plantean las siguientes hipótesis:

- En la Región Sur de la Provincia de Río Negro existen poblaciones de *Astragalus pehuenches* potencialmente toxigénicas y su toxicidad varía entre especímenes y entre diferentes zonas de cosecha.
- El suministro de *Astragalus pehuenches* a cobayos reproduce el cuadro clínico, bioquímico y patológico característico de la enfermedad.
- El suministro de *Astragalus pehuenches* a ovinos reproduce el cuadro clínico, bioquímico y patológico característico de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar el potencial toxigénico de *A. pehuenches* y la enfermedad que provoca al ser consumido por animales.

Objetivos Específicos

- Determinar la distribución y el potencial toxigénico de *Astragalus pehuenches* en la Región Sur de la Provincia de Río Negro.

- Caracterizar la intoxicación por consumo de *Astragalus pehuenches* en cobayos.

- Caracterizar la intoxicación por consumo de *Astragalus pehuenches* en ovinos.

3 CAPITULO I

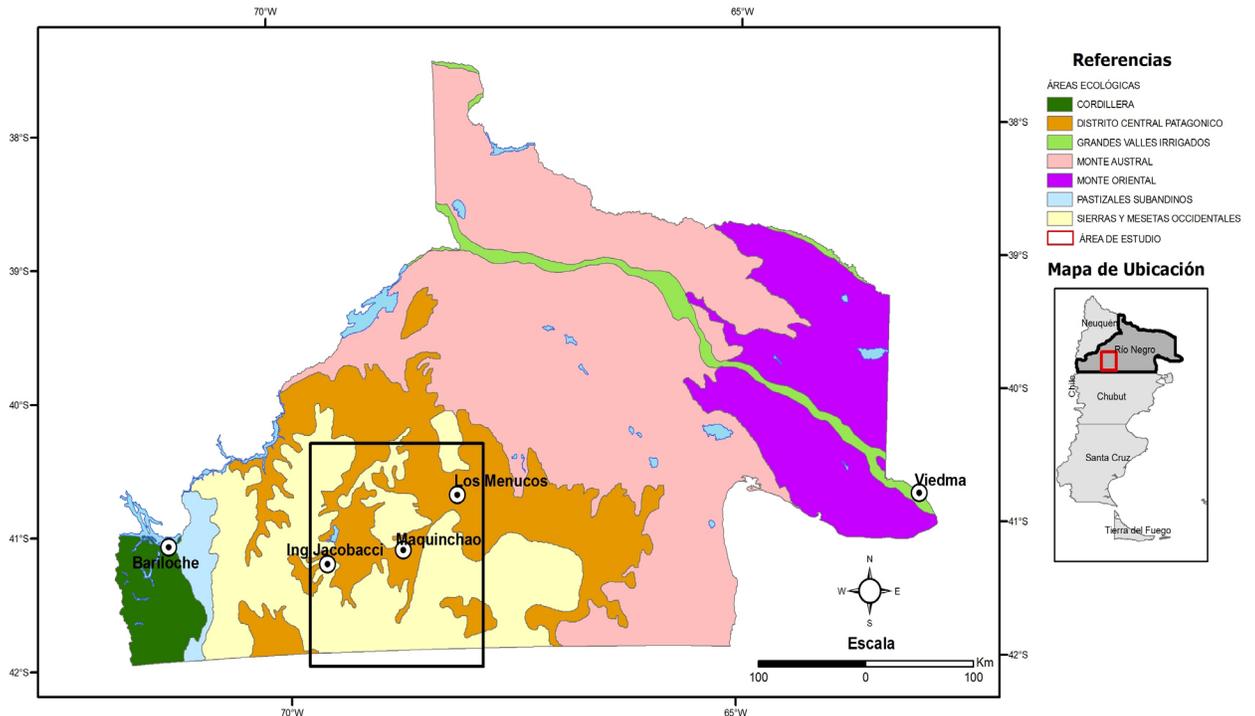
“DETERMINAR LA DISTRIBUCION Y EL POTENCIAL TOXIGÉNICO DE *Astragalus pehuenches* EN LA REGIÓN SUR DE LA PROVINCIA DE RÍO NEGRO”

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Recolección e identificación de *Astragalus pehuenches*.

En los años 2012 y 2013 se realizaron cosechas de ejemplares de *Astragalus pehuenches* en zonas rurales aledañas a las localidades de Los Menucos, Maquinchao e Ingeniero Jacobacci. Estas localidades están ubicadas en la Región Sur de la Provincia de Río Negro, en el área de Meseta Central (o Distrito Central Patagónico), la cual es la transición entre las áreas ecológicas de Sierras y Mesetas y el Monte Austral (**Figura N° 1.1**).

Figura N° 1.1 Mapa de la provincia de Río Negro y sus áreas ecológicas, indicando con el recuadro negro el área donde se cosecharon los especímenes de *Astragalus pehuenches*.



En el primer año, la cosecha se realizó entre el 18 y el 22 de Enero. Con el fin de mantener la trazabilidad y determinar posibles diferencias en la concentración del tóxico según zona recorrida, el material se cosechó y procesó por separado hasta el momento del análisis de SW.

En el segundo año, la cosecha se realizó entre el 15 y 22 de Enero. Este año, además de realizar cosechas masivas, se llevó a cabo el muestreo sistemático de ejemplares individuales para el análisis toxicológico y poder evaluar diferencias de potencial toxigénico según zona geográfica. Es así que para cada zona de cosecha (ej. *Zona: Ing. Jacobacci*) se realizó un muestreo en tres sitios por zona (ej. *Zona: Ing. Jacobacci. Sitio: 2*); y de cada sitio se tomaron tres especímenes (ej. *Zona: Ing. Jacobacci. Sitio: 2. Planta: 3*) los cuales fueron secados, molidos y analizados en forma individual.

En ambos años, la cosecha consistió en realizar un corte mediante tijera sobre la corona de la planta a 1 cm del suelo. Los ejemplares fueron acopiados en un lienzo de algodón para cada sitio estudiado y se pesaron inmediatamente después de la cosecha para conocer el peso húmedo y estimar luego el rendimiento de materia seca.

Un ejemplar entero fue prensado en papel periódico y enviado al Herbario de la FCAYF de la UNLP, para el almacenamiento y la identificación botánica por parte del taxónomo Profesor Dr. Néstor Bayón.

El material recolectado se dejó orear a la sombra por 24-48hs hasta su procesamiento, el cual consistió en separar los tallos (T) de las hojas, flores, frutos y semillas (HFF). Luego cada *pool* fue secado por separado en estufa con ventilación forzada a 55 °C por 48 hs y el material fue triturado con un molino vertical con tamiz de 1mm. El polvo obtenido se almacenó a temperatura

ambiente en envases herméticos, al resguardo de la luz solar y humedad, hasta su análisis toxicológico y elaboración del alimento.

3.1.2 Análisis toxicológico en *Astragalus pehuenches*

Muestras secas y molidas de cada *pool* y planta individuales fueron enviadas al Dr. Dale Gardner del Poisonous Plants Research Laboratory (PPRL) de Logan, Estados Unidos para la detección y cuantificación de SW. La extracción de los alcaloides se realizó con una mezcla de cloroformo y ácido acético. La porción de ácido acético se pasó por resinas de intercambio iónico, reteniendo la swainsonina, la cual se eluyó con solución de hidróxido de amonio y se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masa (HPLC-MS). Los valores de swainsonina son expresados en porcentaje de swainsonina por peso de materia seca de planta (%SW/MS).

3.1.3 Análisis estadístico de los resultados

Los valores de swainsonina de cada espécimen cosechado en el año 2013 fueron volcados en planillas de cálculo (Microsoft Excel®). Para determinar diferencias en las concentraciones de swainsonina según área de cosecha se realizó un test de ANOVA utilizando el Software MedCalc® Versión 11.3.1.0. Valores de $p < 0,05$ se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre áreas de muestreo.

3.2 RESULTADOS

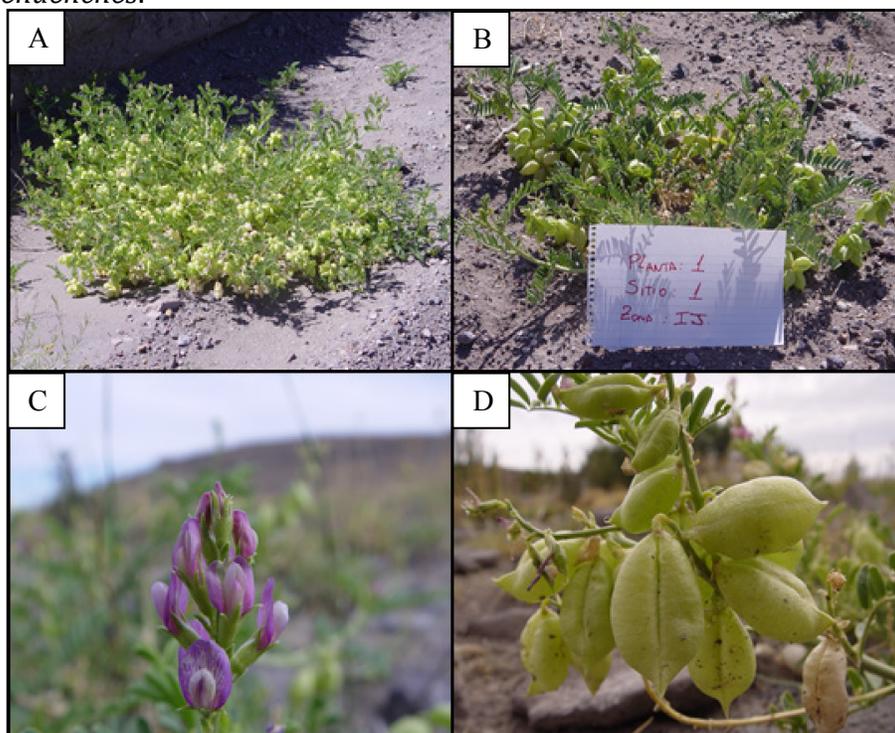
3.2.1 Distribución y caracterización de *Astragalus pehuenches*

El ejemplar enviado a la FCyF de la UNLP para su identificación fue clasificado como *Astragalus pehuenches* Nierdel. (Familia Leguminosa). Nombre vernáculos: “Hierba Loca”, “temblarillera”.

En ambos años de cosecha se recorrió un área de 23400 Km², circunscribiendo zonas aledañas a las localidades de Los Menucos, Maquinchao e Ingeniero Jacobacci.

En las dos campañas de cosecha se encontraron poblaciones con ejemplares de *Astragalus pehuenches* (Figura N° 1.2) en diferentes estados fenológicos: rebrotes, florecido, fructificado y seco. Siendo los estados dominantes el florecido y fructificado.

Figura N° 1.2 (A) Vista de un espécimen completo de *Astragalus pehuenches*; (B) Método de identificación de *Astragalus pehuenches* para el estudio sistemático de caracterización del potencial toxigénico; (C) Inflorescencia violácea; y (D) frutos globosos característicos de *Astragalus pehuenches*.



Los ejemplares fueron encontrados sobre suelo con disturbios, sueltos por remoción o por escurrimiento de cursos de agua y en zonas de peri-mallín. En todos los casos las poblaciones de *Astragalus pehuenches* crecían en “manchones” de tamaños aproximadamente de 50 a 500 m².

En el primer año se recolectaron 29,5 kg de planta verde de lo que se obtuvieron 8,03 kg de material seco, determinando un rendimiento del 27,2%.

En el segundo año se recolectaron 81,6 kg de planta verde de lo que se obtuvieron 23,3 kg de material seco, determinando un rendimiento del 28,5%.

3.2.2 Potencial toxigénico de *Astragalus pehuenches* según zona geográfica

En el año 2012, la concentración de SW para la mezcla de plantas de todas las áreas de cosecha resultó en 0,07 % SW/MS de *Astragalus pehuenches*. En el año 2013, la concentración de SW para la mezcla de todas las áreas de cosecha resultó en 0,097 % SW/MS de *Astragalus pehuenches*.

En la **Tabla N° 1.1** se pueden observar los datos de cosecha de los dos años de estudio.

Tabla N° 1.1 Resultados toxicológicos de *Astragalus pehuenches* cosechados en los años 2012 y 2013 en las tres áreas de la provincia de Río Negro.

Área	Parte planta	% SW/MS	
		2012	2013
Los Menucos	H-F-F-S	0.120	0.102
	Tallos	0.070	0.055
Maquinchao	H-F-F-S	0.080	0.122
	Tallos	0.040	0.066
Ing. Jacobacci	H-F-F-S	0.060	0.149
	Tallos	0.040	0.074
MEZCLA		0.070	0.097

Ref.: H-F-F-S, Hojas-Flores-Frutos-Semillas.

En el estudio sistemático del año 2013, en todos los sitios de recolección se encontraron ejemplares en diversos estados fenológicos. En la **Tabla N° 1.2** se aprecian las concentraciones promedios de SW y sus desvíos para cada sitio y zona estudiada.

Tabla N° 1.2 Promedio y desvío estándar ($\pm DE$) de las concentraciones de swainsonina (SW) en especímenes de *Astragalus pehuenches* muestreados en cada sitio con las coordenadas, correspondiente a cada zona de cosecha.

Zona	Sitio	Coordenadas	msnm	% SW $\pm DE$ /sitio (n:3)	% SW $\pm DE$ /zona (n:8)
Los Menucos	1	40°33'18.6 S 68°36'08.9 O	1197	0,096 $\pm 0,043$	
	2	40°21'03.6 S 68°45'49.3 O	1143	0,150 $\pm 0,049$	0,13 $\pm 0,016$
	3	40°28'54.4 S 68°45'45.3 O	1144	0,130 $\pm 0,027$	
Maquinchao	1	41°29'55.5 S 68°34'38.6 O	979	0,075 $\pm 0,067$	
	2	41°37'03.3 S 68°21'27.6 O	1114	0,125 $\pm 0,0$	0,09 $\pm 0,022$
	3	41°41'12.5 S 68°05'24.3 O	1054	0,079 $\pm 0,087$	
Ing. Jacobacci	1	41°38'17.4 S 69°22'50.0 O	1067	0,097 $\pm 0,027$	
	2	41°58'24.3 S 69°38'42.3 O	1069	0,130 $\pm 0,029$	0,11 $\pm 0,01$
	3	41°31'41.8 S 69°50'29.8 O	1080	0,117 $\pm 0,027$	

Ref.: S: Sur; O: Oeste; msnm: metros sobre el nivel del mar

Las concentración de SW fue variable, tanto intersitio como intrasitio, encontrándose especímenes con valores en un rango de 0,001 % SW/MS y 0,204 % SW/MS.

Cuando se analizaron las concentraciones de SW según zona de cosecha no difirieron significativamente ($p=0,27$).

3.3 DISCUSION

El único reporte en el cual se determinó la presencia de swainsonina en *Astragalus pehuenches* es el de Molyneux y Gómez-Sosa (1991) donde sobre dos ejemplares herborizados obtuvieron concentraciones de 0,028 y 0,034 % SW/MS. El presente trabajo es el primer estudio toxicológico en *Astragalus pehuenches* realizado sobre especímenes de campo, lo que permite estimar con mayor certeza el potencial toxigénico de la especie en la región, con valores comprendidos entre 0,07 a 0,097 %SW/MS.

Se determinó la distribución de *Astragalus pehuenches* en un área de 23400 Km² en la región sur de la provincia de Río Negro. El crecimiento de la planta se observó en terrenos entre los 979 y 1197 msnm, bajo el patrón de manchones en suelos con disturbios y bordes de mallines, coincidiendo con reportes previos (Gómez-Sosa, 1979).

La extensión del territorio relevado, la cantidad de plantas cosechadas y analizadas en los dos años de estudio establecen una adecuada representatividad del muestreo para evaluar el potencial toxicológico de poblaciones de *Astragalus spp* en la región (Gardner y col, 2001; Cook y col, 2011).

Las concentraciones de SW en las tres áreas y en los dos años de estudio fueron, en promedio 70 a 100 veces, superiores al umbral tóxico de los *Astragalus* y *Oxytropis* que según Molyneux y col, (1995) establecieron en 0,001%. De esta forma se determinó la existencia de poblaciones regionales de *Astragalus pehuenches* con alto potencial toxigénico para generar enfermedad. Los niveles de SW encontrados en este estudio son similares a los reportados por Gardner y col (2001), quienes hallaron valores promedios entre 0,046% y 0,097% en especies de *Oxytropis* en cuatro estados del sudoeste de los Estados Unidos (Gardner y col, 2001).

Si bien se sabe que la swainsonina es producida por endófitos (Grum y col, 2003; Cook y col, 2011), la concentración de la misma en las plantas es variable y se estima que está condicionada por factores ambientales y geográficos (Gardner y col, 2001). Rhoades (1979) sugiere que en condiciones adversas, las plantas tienden a aumentar sus defensas favoreciendo, en sus simbiontes, la síntesis de componentes tóxicos como los alcaloides. En este sentido, fue que se realizó el muestreo para evaluar las concentraciones de swainsonina en diferentes poblaciones ubicadas en distintas zonas de la provincia de Río Negro. Sin embargo, en el presente trabajo no se hallaron diferencias entre poblaciones de *Astragalus pehuenches* según zona de cosecha ($p=0,27$), posiblemente esto se deba a que las zonas abarcadas en este estudio son homogéneas tanto ambiental, climática y geográficamente (Bran y col, 2000).

La alta variabilidad en la concentración de swainsonina entre especímenes que se observó en el Sur de Río Negro, coincide con los resultados obtenidos por Gardner y col (2001) quienes observaron variabilidades entre 0,03% a 0,21% de SW en una población de *Oxytropis sericea* en el oeste de Estados Unidos. Debido a esta variabilidad, el potencial toxigénico de una población de *locoweeds* está conformada por el promedio de las concentraciones de swainsonina de cada planta que integra a la población (Gardner y col, 2001).

4 CAPITULO II

“CARACTERIZAR LA INTOXICACIÓN POR CONSUMO DE *Astragalus pehuenches* EN COBAYOS”

4.1 MATERIALES Y METODOS

4.1.1 Diseño experimental

Se utilizaron 10 cobayos (*Cavia porcellus*) hembras no preñadas Cepa Hartley de 4 semanas de edad con un peso vivo de 200 gramos. Los cobayos se alojaron individualmente en jaulas enrejadas de acero galvanizado de 40x40x50 cm y bandeja de acero inoxidable desmontable. Para el enriquecimiento ambiental se colocó un tubo de PVC como refugio. Los animales fueron suministrados por el Bioterio del Instituto Biológico “Dr. Tomás Perón” de Gonnet, Provincia de Buenos Aires.

La ventilación se controló mediante la apertura o cierre de tomas de aire ubicadas en la sala donde estaban alojados los animales. La temperatura fue controlada mediante el encendido de estufas eléctricas o apertura de toma de aire, registrándose por medio de un termómetro. La temperatura del ambiente osciló entre un mínimo de 18°C y un máximo de 24°C. La iluminación fue controlada mediante dispositivo automático de encendido y apagado que aseguraba 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad. La limpieza se realizaba todos los días con el cambio de la cama de viruta, lavado de bebederos y comederos, y cada 15 días se limpiaba la sala por completo.

Protocolo de intoxicación

Luego de un período de acostumbramiento de tres semanas que consistió en la adaptación de los animales en las jaulas, alimentación y maniobras de limpieza, se procedió al inicio del protocolo de intoxicación. Durante 54 días según grupo experimental, se administró diariamente

38±2 gramos por animal de “*Locopellets*”^(*) al grupo tratado (GT n=6) y alimento balanceado comercial al grupo control (GC n=4). El polvo de planta utilizado para este ensayo corresponde al cosechado en el año 2012, siendo la concentración de swainsonina (SW) de 0,07% (ref. Capítulo I, pág.31). El consumo se midió mediante la determinación de la diferencia entre el alimento ofrecido y el remanente dejado al día siguiente pesado con balanza electrónica. Además del alimento en forma de *pellets*, se suministró 25 gramos por animal de hojas de hinojo (*Foeniculum vulgare*) verde fresco dos veces por semana y agua corriente *ad libitum*.

Todos los experimentos con animales fueron evaluados y aprobados con N° de protocolo 20-1-11, por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

4.1.2 Estudios clínicos

En ambos grupos se registraron el consumo de *pellet* diariamente y en forma semanal el peso vivo, estado clínico general y la evaluación neurocomportamental mediante los siguientes test:

4.1.2.1 Prueba de actividad a campo abierto (*Open Field*).

Este test consiste en colocar individualmente a los animales dentro de un cajón abierto (120x120x50 cm), el cual posee la base dividida en 25 cuadrantes simétricos. La observación se realiza por un tiempo de 5 minutos y se contabilizan: las veces que el animal cruza cada cuadrante, el número de alzadas (cuando el animal se mantiene sin apoyar los miembros

* *Locopellets*: Alimento compuesto por 67% de polvo de alimento balanceado comercial (Aligran ®) y 33% de polvo de *Astragalus pehuenches*, reconstituido en forma de pellet.

delanteros), el número de aseos (cuando el animal se higieniza), y mediante cronómetro se determina el tiempo de inmovilidad. Al retirar el animal del cajón se contabilizan los bolos fecales excretados (Robinson y col, 2008).

4.1.2.2 Prueba de evaluación de la marcha (FootPrint).

Dentro de un cajón abierto en forma de callejón (100x15x30 cm) se coloca un papel blanco en el piso. Sobre un extremo se ingresa al animal y sobre el otro extremo se coloca comida para estimular el desplazamiento. Al animal se le pinta las plantas de los miembros posteriores con colorante comestible no tóxico. La evaluación consiste en medir la distancia transversal y longitudinal entre las huellas dejadas por los miembros posteriores (Hemsley & Hopwood, 2005).

4.1.3 Estudios bioquímicos

Sangre

Con frecuencia quincenal se extrajo sangre mediante la punción de la vena cava anterior, previa anestesia de los animales con 1ml de ketamina y 0,6ml de xilacina. Para la extracción de sangre se utilizaron agujas 27G y jeringas de 1ml. La sangre obtenida se colocó en tubos Eppendorf con 400UI de heparina y se centrifugó inmediatamente para obtener el plasma.

En el momento del sacrificio, se pudo extraer un mayor volumen sanguíneo que permitió obtener suero para la determinación del perfil enzimático clínico.

4.1.3.1 Perfil enzimático.

Actividad enzimática clínica

Las enzimas evaluadas fueron alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatina fosfoquinasa (CPK).

Determinación del intervalo de referencia para la actividad α -manosidasa.

Para determinar el valor de referencia de la actividad de la α -manosidasa plasmática en la especie cobayo, se estableció el intervalo de referencia (IR) en 15 animales de similar características en sexo, cepa, edad y ambiente que los utilizados para el ensayo. Tanto para la determinación del IR y los análisis de α -manosidasa en los animales en ensayo se aplicó el método de dosaje enzimático en muestras de plasma.

Actividad enzimática de α -manosidasa en plasma.

El análisis se realizó bajo el protocolo citado por Bedin y col (2010). Brevemente, el suero se analizó por duplicado. En un pocillo se adicionó como sustrato al 4-MU- α -D-manósido (*Glycosynth*) y en otro se dejó como blanco, se incubaron y la reacción se detuvo con buffer glicina-NaOH. La fluorescencia se midió con excitación de 360 nm y emisión de 450 nm. Para calcular el valor de actividad enzimática se restó a la fluorescencia de cada muestra la fluorescencia de su blanco correspondiente.

Control de especificidad: actividad de β -galactosidasa.

Para controlar la especificidad de la reacción enzimática y el efecto de la toxina, se determinó la actividad de otra enzima lisosomal la β -galactosidasa, utilizando el mismo protocolo que para la α -manosidasa, modificándose el sustrato específico para la enzima 4-MU- β -D-galactósido (*Glycosynth*).

Orina

La toma de muestra de orina se realizó con frecuencia semanal. Para ello, se colocaba cada cobayo en una bandeja de acero inoxidable limpia y sin viruta. Se aguardaba que el animal

orinase de forma voluntaria y luego se recolectaba la orina mediante jeringa. La orina era colocada en tubos Eppendorf, identificados y almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

4.1.3.2 Determinación de oligosacáridos (OLS).

En primer lugar se determinó la cantidad de creatinina en las muestras de orina mediante método de Jaffe y luego se determinó la presencia de OLS realizando una cromatografía en capa delgada TLC-HPTLC (Bedin y col 2009). Brevemente, se activaron las placas y luego se sembró cada muestra de orina homogenizada. Como patrones se utilizó lactosa y rafinosa. La placa se colocó en la cuba electroforética donde se realizaron dos corridas. Se reveló con solución de Orcinol 0.2% y luego se calentó en estufa a 100°C durante 10-15 minutos (Bedin y col, 2009).

4.1.4 Estudios patológicos

En el día 54 los animales fueron sacrificados previa anestesia con 2ml de ketamina y 1ml de xilacina. Se realizó la perfusión intracardíaca de paraformaldehído al 4%. Luego se efectuó la necropsia evaluando alteraciones macroscópicas y se obtuvieron muestras de sistema nervioso central (SNC), hígado, riñón y útero. Todas las muestras obtenidas se continuaron fijando por 24 hs en formol bufferado, excepto el SNC el cual fue extraído con su carcasa ósea (cráneo y columna vertebral) y fijado por 48 hs. Pasado el periodo de fijación se trasvasaron a alcohol 70° hasta su inclusión en parafina. En el caso del SNC este período no excedió los 5 días según recomendaciones de Fix & Garman (2000).

Para la evaluación histopatológica del SNC se realizaron cortes obteniendo secciones coronales determinadas según regiones y núcleos encefálicos seleccionados (Paxinos & Watson, 2007).

4.1.4.1 Tinción de hematoxilina y eosina (HE).

Las muestras fijadas fueron procesadas con las técnicas histológicas de rutina, siendo incluidas en bloques de parafina, cortadas con un espesor de 5µm y coloreadas con la técnica de hematoxilina y eosina (HE) para la observación bajo microscopía óptica convencional. Sobre los cortes del sistema nervioso central se evaluó el grado de lesión clasificándolos según la intensidad de vacuolización en nulo (0), leve (1), moderado (2) y severo (3).

4.1.4.2 Técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET).

En el caso particular del sistema nervioso central y tejido uterino se tomaron muestras para la observación mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Las muestras cuboides de 1 mm³, fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 2%, posfijadas en solución de tetróxido de osmio al 1% e incluidas en resina (Epon®).

Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos (60-90 nm), que fueron contrastados con acetato de uranilo y montados para la observación con un microscopio electrónico JEOL 1210.

4.1.4.3 Técnica de lectinohistoquímica (LHQ).

La técnica de lectinohistoquímica permite establecer el patrón de distribución de los carbohidratos almacenados en las diferentes células del sistema nervioso central. La técnica se aplicó sobre tejido previamente fijado, parafinado y cortado a 5µm. Los cortes fueron incubados con seis lectinas a una concentración de 30µg/ml, según se detallan en la **Tabla N° 2.1**. Como sistema de detección se utilizó el método basado en estreptavidina-biotina (Dako, Carpintería, CA). Como cromógeno se utilizó 3,3'diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB) (Dako, Carpintería, CA). Se utilizó hematoxilina de Harris como coloración de contraste. Los cortes se

clasificaron según la intensidad de coloración en nulo (-), pobre (+), moderado (++) y fuerte (+++).

Tabla N° 2.1 Lectinas empleadas con su nombre completo y acrónimos, especificando los carbohidratos a las cuales son afines.

Lectina	Acrónimo	Afinidad
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNAc; NeuNAc
<i>Succinil-WGA</i>	sWGA	(α -(1-4)-D- GlcNAc) ₂
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	β -D-Man; α -D-Glc
<i>Lens culinaris</i>	LCA	α -Glc, α -D-Man
<i>Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin</i>	PHA-L	N-glicanos triantenario, glisectado
<i>Bandeiraea simplicifolia-I</i>	BSL-I	α -D-Gal, α -GalNAc

4.1.4.4 Técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

La inmunohistoquímica se utilizó para determinar el grado de expresión celular de proteínas que se manifiestan en mayor medida cuando ocurren reacciones neuronales ante un proceso patológico. Se utilizaron 3 anticuerpos: proteína glial fibrilar (GFAP), proteína adaptadora ionizante de molécula unión a calcio 1 (Iba-1) y ubiquitina. La *GFAP* es expresada por astrocitos que son responsables de la remodelación del tejido nervioso. La *Iba-1* es expresada por la microglía que en determinados procesos nosológicos se presentan agrupadas y en mayor número. La *ubiquitina* es expresada en axones en los que se ha activado el sistema no lisosomal de degradación proteica del citoesqueleto filamentoso anormal. Los anticuerpos primarios se utilizaron con las siguientes concentraciones: proteína gliofibrilar ácida (GFAP, 1:100) (Dako, Carpintería, CA), proteína adaptadora ionizante de molécula unión a calcio 1 (Iba-1, 1:500) (Abcam) y ubiquitina (1:500) (Dako, Carpintería, CA). Como sistema de detección se utilizó el

método basado en polímero dextrano (Universal EnVision®System, DakoCytomation) siguiendo las indicaciones del laboratorio. Como cromógeno se utilizó 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB) (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Se utilizó hematoxilina de Harris como coloración de contraste.

4.1.5 Análisis estadístico de los resultados

Los datos recolectados de cada observación fueron volcados en planilla de cálculo (Microsoft Excel®). Para las variables consumo diario, ganancia de peso, peso vivo, ancho y largo del paso, cruces e inmovilidad en Campo Abierto se realizaron evaluaciones *a priori* para determinar el modelo de covarianzas. Una vez establecido el modelo, se compararon las medias de los grupos mediante un modelo de medidas repetidas en el tiempo mediante el Proc Mixed SAS®. Valores de $p < 0,05$ se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Hallazgos clínicos

Al comienzo del ensayo los animales presentaron estado general saludable con pelaje brillante, mirada atenta y movimientos coordinados.

En las primeras dos semanas del ensayo se registró una disminución abrupta del consumo de *Locopellets* por parte del grupo tratado. En la tercer semana el consumo del grupo tratado se equiparó al consumo del grupo control sin mostrar diferencias significativas entre grupos ($p=0,073$). Desde la cuarta semana hasta el final del ensayo (8ª semana) los animales del grupo tratado consumieron entre 10 y 17 % menos de alimento que el grupo control, estableciéndose diferencias significativas ($p<0,05$). La ganancia del peso vivo también fue menor para los animales tratados comparado con los controles ($p<0,05$).

A lo largo del ensayo se observaron diferencias significativas en el peso vivo entre animales tratados y animales controles ($p<0,05$). Los resultados de los parámetros clínicos evaluados se resumen en la **Tabla N° 2.2**.

Tabla N° 2.2. Promedios y desvío estándar (\pm DE) del consumo de pellets, ganancia de peso, dosis de swainsonina diarios, peso vivo inicial y final, en los dos grupos de cobayos.

Grupo	GC	GT
Consumo de pellet (gr/cobayo/día)	36,9 \pm 0,8	25,7 \pm0,7 *
Ganancia de peso (gr/día)	4,7 \pm 0,2	2,1 \pm0,3 *
Dosis real de swainsonina (mgSW/kg/día)	0 \pm 0,0	18,0 \pm3,7 *
Peso vivo inicial (gr)	277,7 \pm 8,9	272,8 \pm 9,8
Peso vivo final (gr)	544,7 \pm 21,8	394,8 \pm42,8 *

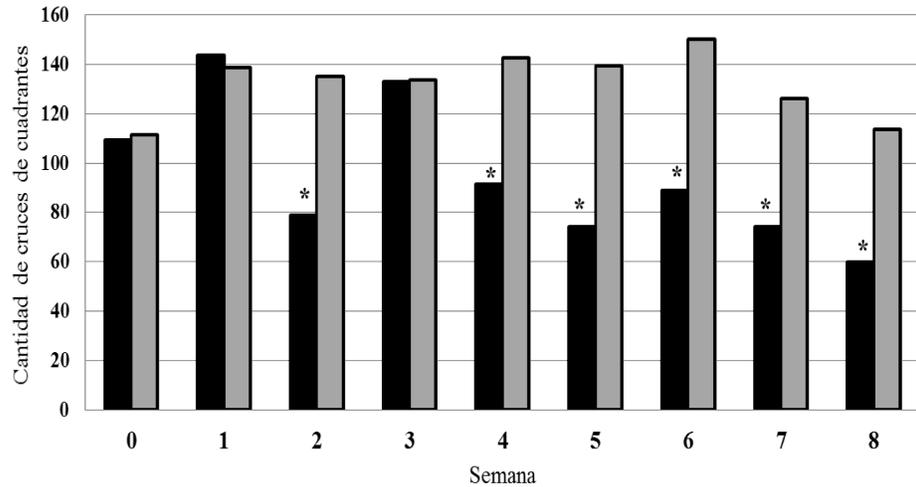
Ref.: (*): diferencias significativas entre grupos

En las primeras dos semanas de ensayo, en los animales tratados y los animales controles no se observaron signos clínicos. A partir de la tercera semana de ensayo en el grupo tratado se observó pérdida de condición corporal, presentación de pelo hirsuto, lordosis, debilidad y fasciculaciones musculares fuertes que generaban brinco del animal sobre el mismo lugar. Estas fasciculaciones eran con mayor frecuencia e intensidad en la etapa de recuperación anestésica, luego de la extracción de sangre.

4.2.1.1 Prueba de actividad a campo abierto (Open Field)

Mediante este test se determinó el grado de movilidad que tenían los animales de los grupos experimentales. Como se aprecia en la **Figura N° 2.1**, los animales del grupo tratado disminuyeron su actividad ambulatoria, detectándose diferencias significativas en números de cruces de cuadrantes entre ambos grupos en la segunda y a partir de la cuarta semana hasta el final del ensayo ($p < 0,05$). En la tercera semana se observó una paridad en el número de cruces realizados para ambos grupos ($p = 0,83$).

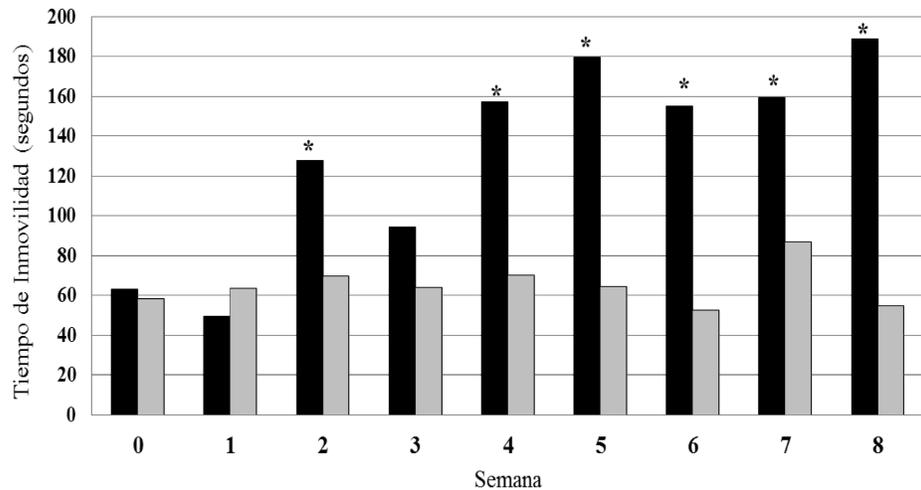
Figura N° 2.1: Evolución de la actividad exploratoria medido en la cantidad de cruces de cuadrantes, de los cobayos que consumieron *Astragalus pehuenches* (GT: barras negras), comparado con los cobayos controles (GC: barras grises).



Ref.: (*) Diferencias significativas entre grupos

El tiempo que permanecían inmóviles coincidió con la disminución de la actividad exploratoria, resultando inversamente proporcional con el patrón de cruces de cuadrantes (**Figura N° 2.2**).

Figura N° 2.2. Evolución del tiempo de inmovilidad medido en segundos, de los cobayos que consumieron *Astragalus pehuenches* (GT: barras negras), comparado con los cobayos controles (GC: barras grises).



Ref.: (*) Diferencias significativas entre grupos

4.2.1.2 Prueba de evaluación de la marcha (FootPrint).

Este test determina el grado de incoordinación esperando que un animal atáxico demuestre un patrón correspondiente a un aumento de la base de sustentación (mayor distancia transversal) e hipermetría (mayor distancia longitudinal).

Los resultados obtenidos no determinan diferencias significativas ni en el ancho ($p=0,36$) ni en el largo del paso ($p=0,24$) para los dos grupos experimentales.

4.2.2 Hallazgos bioquímicos

4.2.2.1 Perfil enzimático

De las tres enzimas evaluadas (ALT, AST, CPK) solo la AST en el grupo tratado se elevó sobre el valor de referencia. Para el caso de la CPK, si bien ambos grupos están dentro del rango de referencia se aprecia que el grupo tratado tiene menor actividad enzimática que el grupo control (Tabla N° 2.3).

Tabla N° 2.3 Valores promedios y desvío estándar (\pm DE) de los niveles de enzimas séricas evaluadas en el momento del sacrificio en ambos grupos experimentales.

Enzima	Grupo Control	Grupo Tratado	VR
ALT	41,0 \pm 7,6	31,1 \pm 4,1	\leq 45
AST	38,1 \pm 0,7	386,2 \pm37,2	\leq 42
CPK	166,2 \pm 76,2	36,4 \pm 21,4	\leq 174

Ref.: ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; CPK, creatinina fosfoquinasa. Valores expresados en UI \pm DE. VR: Valor Referencia.

Actividad enzimática de α -manosidasa en plasma.

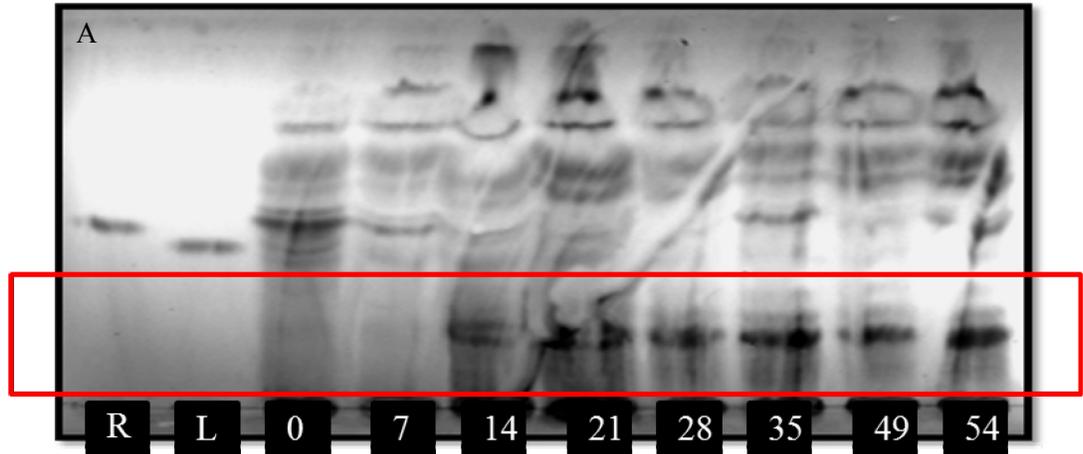
La evaluación de la actividad enzimática α -manosidasa plasmática no se logró efectuar debido a dificultades técnicas en obtener volúmenes constantes en cada extracción de sangre, determinando la baja eficiencia en la extracción de volumen plasmático. La limitante en la posibilidad fisiológica de extracción sanguínea en cobayos (1 ml cada 15 días) sumada a la

necesidad de anestesiarlos, llevó a que la extracción sanguínea sea variable entre semana de muestreo. Para los estudios de evaluación de la actividad enzimática de la α -manosidasa, se necesitó sangre entera por lo que se utilizó heparina como anticoagulante estableciéndose mediante pruebas preliminares un volumen óptimo eficaz de heparina (80 μ l). Como se mencionó anteriormente, el volumen sanguíneo máximo de extracción es de 1ml, el cual no fue logrado en todos los muestreos; por lo tanto el volumen plasmático obtenido luego de la centrifugación era del orden de 100 y 300 μ l. Este volumen corresponde al plasma sumado a la heparina de volumen constante que representó entre un 30 y 80% del volumen. Esta variabilidad en la proporción generó que algunas semanas el plasma era más “puro” y en otras más “diluido”, obteniendo resultados de actividad enzimática dispares. La interpretación de estos resultados fue imposible de llevar a cabo mediante análisis estadístico.

4.2.2.2 Hallazgos en orina

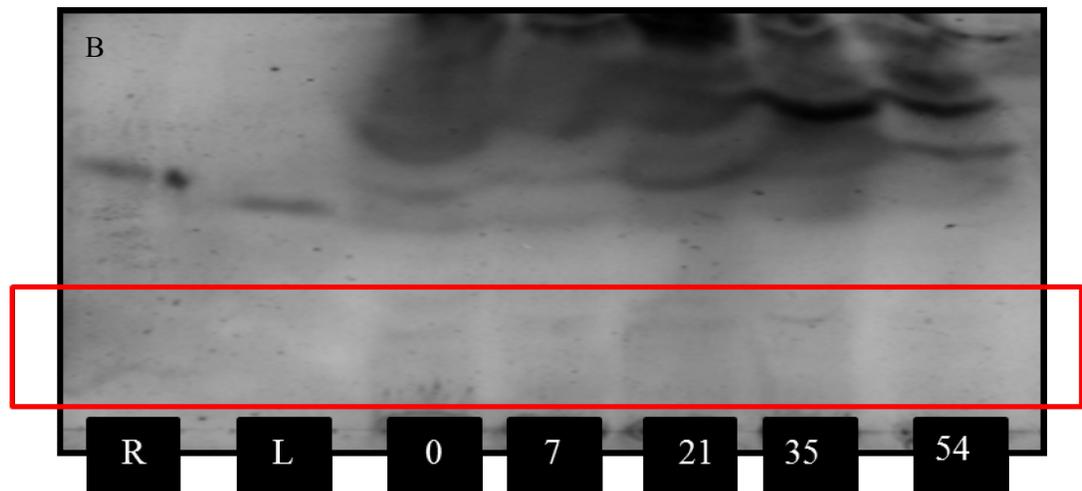
En los animales del grupo tratado se observó una banda correspondiente a la excreción de oligosacáridos (OLG) en orina a partir de la segunda semana de intoxicación, la cual persistió hasta la semana de sacrificio (**Figura N° 2.3**). La observación de las bandas es de carácter cualitativo, sin embargo se apreció una coloración mayor a medida que avanzaban las semanas de intoxicación. En los animales del grupo control no se observó ninguna banda correspondiente a oligosacáridos (**Figura N° 2.4**).

Figura N° 2.3 Placa de cromatografía delgada de la orina de un cobayo del grupo tratado recolectada en el periodo de intoxicación experimental. El recuadro rojo marca la zona donde se observan las bandas correspondientes a OLG a partir del día 14.



Ref.: R: rafinosa; L: lactosa- azúcares utilizados como patrones-. Los números en el borde inferior indican los días de intoxicación.

Figura N° 2.4 Placa de cromatografía delgada de la orina de un cobayo del grupo control recolectada en el mismo periodo de intoxicación experimental. El recuadro rojo marca la zona donde debieran observarse las bandas correspondientes a los OLG.



Ref.: R: rafinosa; L: lactosa- azúcares utilizados como patrones-. Los números en el borde inferior indican los días de intoxicación

4.2.3 Hallazgos patológicos

Hallazgos macroscópicos

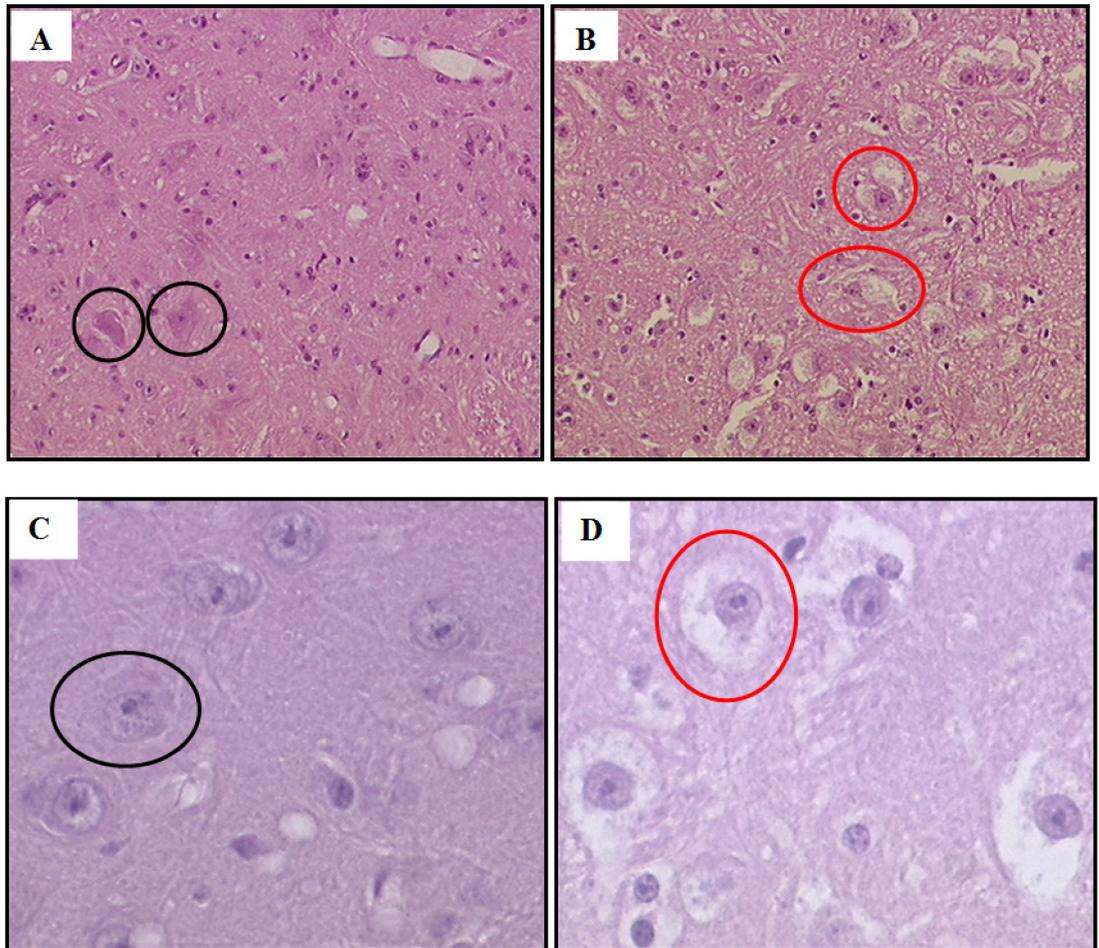
A la necropsia se corroboró la pobre condición corporal de los cobayos del grupo tratado con escasa deposición de tejido graso en el subcutáneo de la zona cervical y en órganos internos como perirrenal y epicárdica, en comparación con los cobayos del grupo control. En ambos grupos no se observaron alteraciones en tamaño, color y consistencia en los órganos evaluados.

Hallazgos microscópicos

a) Sistema nervioso central

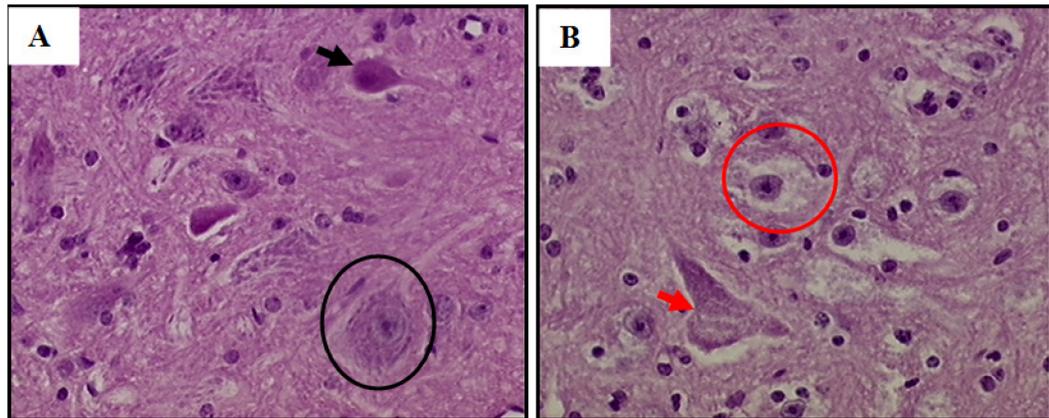
En las muestras de cobayos del grupo tratado, se apreció un grado variable de vacuolización, cromatólisis y desplazamiento del núcleo hacia la periferia clasificado como *degeneración celular*, con compromiso de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Se distinguen dos tipos de patrones de vacuolización según neurona estudiada, a saber: i) en neuronas del núcleo hipogloso la cromatólisis es total, con vacuolas que coalescen con aspecto de “burbujas” generando una disrupción total del citoplasma y produciendo cambios evidentes en la arquitectura celular (**Figura N° 2.5**); ii) en neuronas del núcleo reticular lateral, la cromatólisis es central y parcial, con aspecto de puntillado vacuolar fino dilatando solo el cuerpo neuronal sin perder la morfología de la célula.

Figura N° 2.5 Diferentes núcleos encefálicos. (A-B) Núcleo hipoglosos; (C-D) Tálamo. (A y C) grupo control. (B y D) grupo tratado. Círculos negros: neuronas sanas; círculos rojos: neuronas con vacuolización.



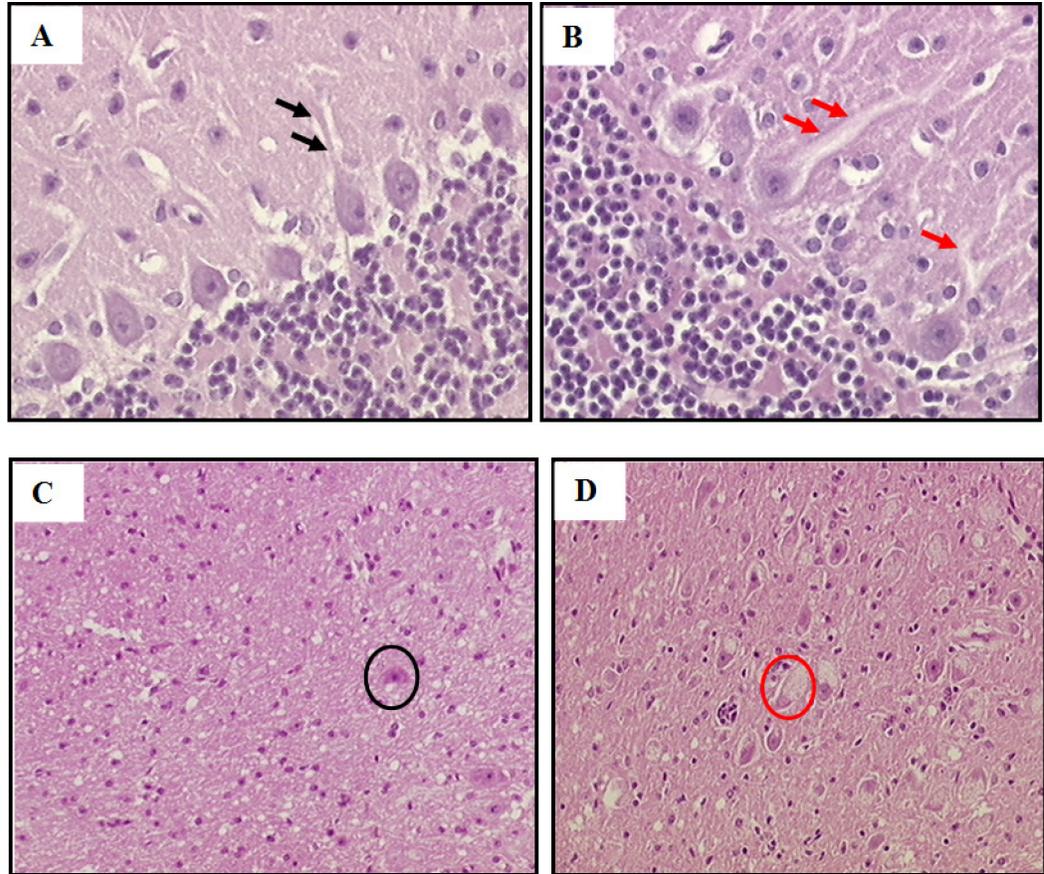
De forma similar a la sección de la médula oblonga, en médula espinal se observaron diferencias en el grado de vacuolización según célula estudiada. En motoneuronas se observa severa vacuolización con disrupción total del citoplasma, en cambio en las pequeñas neuronas del asta ventral la vacuolización es más difusa y no compromete la arquitectura neuronal (**Figura N° 2.6**).

Figura N° 2.6 (A) Neuronas grandes: motoneuronas (círculo negro) y pequeñas (flecha negra) de un cobayo del GC. Nótese la preservación de la sustancia de Nissl en las motoneuronas. (B) Diferentes grado y tipo de lesión: severa vacuolización en motoneuronas (círculo rojo) de un cobayo del GT, perdiendo por completo la observación de la sustancia de Nissl. Neuronas pequeñas con difusa vacuolización (flecha roja)



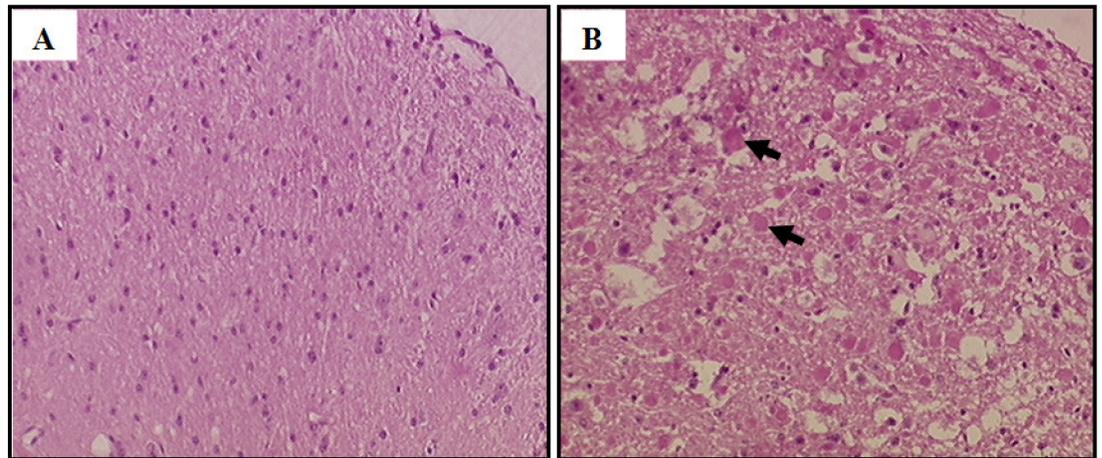
En el cerebelo de cobayos del grupo tratado fueron observados similares grados de vacuolización que en áreas del encéfalo, afectando principalmente las neuronas de los núcleos profundos. El árbol dendrítico y axones de las células de Purkinje se encontraban aumentados de 2 a 3 veces en espesor, modificando la arquitectura de la capa molecular (**Figura N° 2.7**). Además, se observó vacuolización en las neuronas de la capa granular y las células de Golgi.

Figura N° 2.7 (A) Células de Purkinje en un cobayo del GC y (B) del GT. Nótese la moderada vacuolización y aumento del espesor del árbol dendrítico (flechas rojas). (C) Núcleo profundo del cerebello en un cobayo del GC y (D) de GT. La severa vacuolización ocupa todo el citoplasma desplazando el núcleo hacia la periferia (círculo rojo). Flechas y círculo negro: neuronas sanas



Específicamente en los núcleos *gracilis* y *cuneiforme* de la médula oblonga y en cercanía a las neuronas de los núcleos profundos del cerebello, se observaron numerosas estructuras circulares eosinofílicas de diversos tamaños, clasificados como esferoides axonales (**Figura N° 2.8**).

Figura N° 2.8 (A) Núcleo gracilis de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese los numerosos esferoides (flechas)



En los cobayos del grupo tratado, el grado de vacuolización varió en leve, moderado y severo según animal, región encefálica, núcleo encefálico y tipo de neurona. Los núcleos con vacuolización más severa fueron el hipogloso y los núcleos profundos del cerebelo. En los cobayos del grupo control no se observaron lesiones (**Tabla N° 2.4**).

Tabla N° 2.4 Promedio del grado de vacuolización citoplasmática observada en diferentes áreas del SNC para ambos grupos de cobayos.

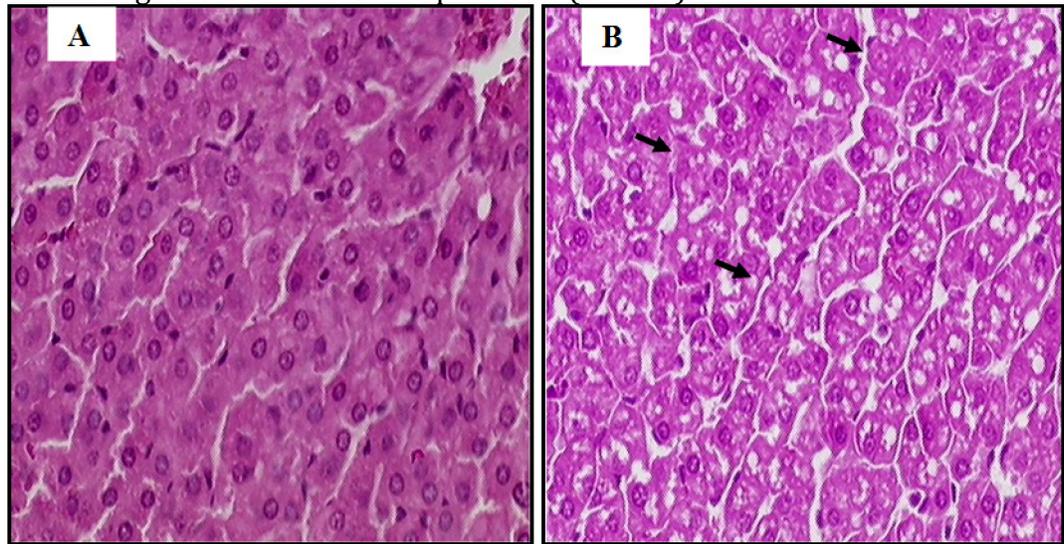
Núcleo nervioso evaluado	Grupo	
	GC (n=4)	GT (n=6)
Células de Purkinje	0	1.83
Núcleos profundos del Cerebelo	0	2.33
Corteza Motriz	0	1.16
Núcleo <i>gracilis</i>	0	2.16
Núcleo Cuneiforme	0	1.16
Núcleo Hipogloso	0	2.40
N. dorsal del Vago	0	0.60
N. Trigémico Espinal	0	1.00
N. Solitario	0	2.00
Núcleo Reticular Lateral	0	1.40
Núcleo Reticular Medular	0	2.16
Asta ventral de médula espinal	0	2.16

Ref.: Escala de 0: sin lesión; 1: leve; 2: moderado; y 3: severo.

b) Hígado

La principal alteración que se observó en el hígado fue la vacuolización de hepatocitos sin seguir un patrón histológico específico (**Figura N° 2.9**). La estructura general se observó alterada con desorganización de los cordones hepáticos.

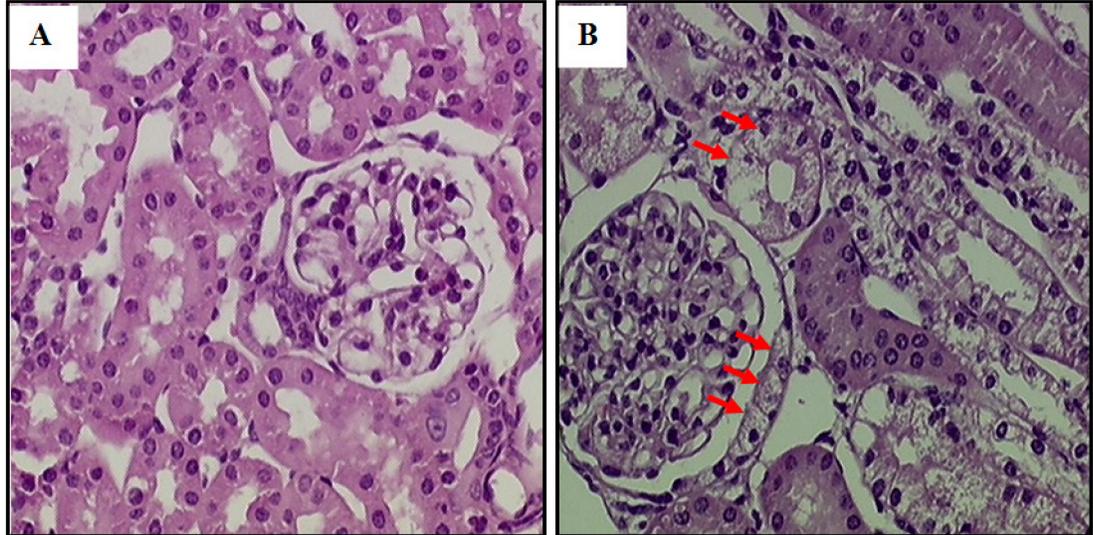
Figura N° 2.9 (A) Parénquima hepático de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese la vacuolización generalizada de los hepatocitos (flechas)



c) Riñón

En este órgano la vacuolización se observó en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales de la corteza renal y los túbulos colectores principalmente de la región medular de los cobayos del grupo tratado. En algunos glomérulos se observó severa vacuolización en las células de la *macula densa* (**Figura N° 2.10**).

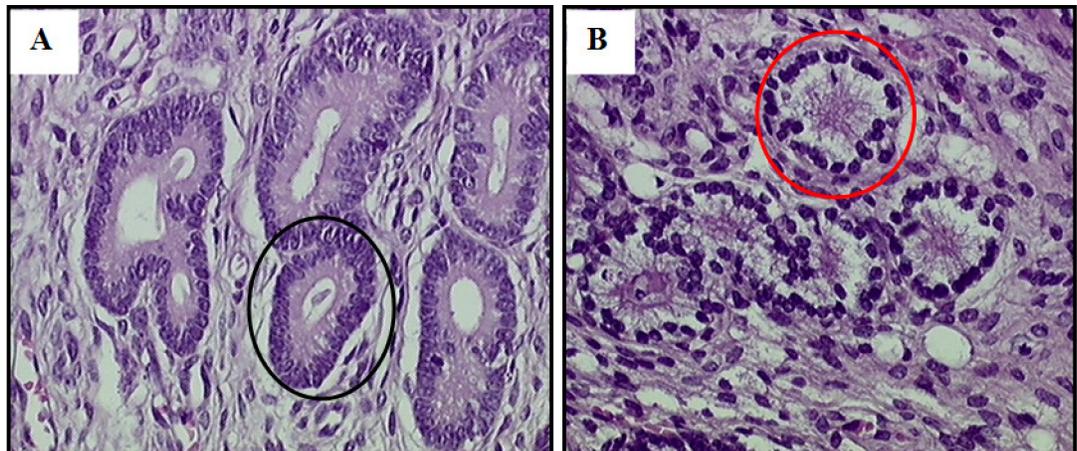
Figura N° 2.10 (A) Tejido renal de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese la vacuolización en células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y macula densa (flechas rojas).



d) Útero

Se observó vacuolización apical de células de las glándulas endometriales con menor secreción endometrial y de menor absorción tintorial, en los cobayos del grupo tratado comparado con el grupo control. En células miometriales, epitelio endometrial y fibroblastos se observó una vacuolización fina y generalizada (**Figura N° 2.11**).

Figura N° 2.11 (A) Glándulas uterinas de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Nótese la vacuolización en células glandulares y en fibroblastos (círculo rojo). Círculo negro: glándula normal.



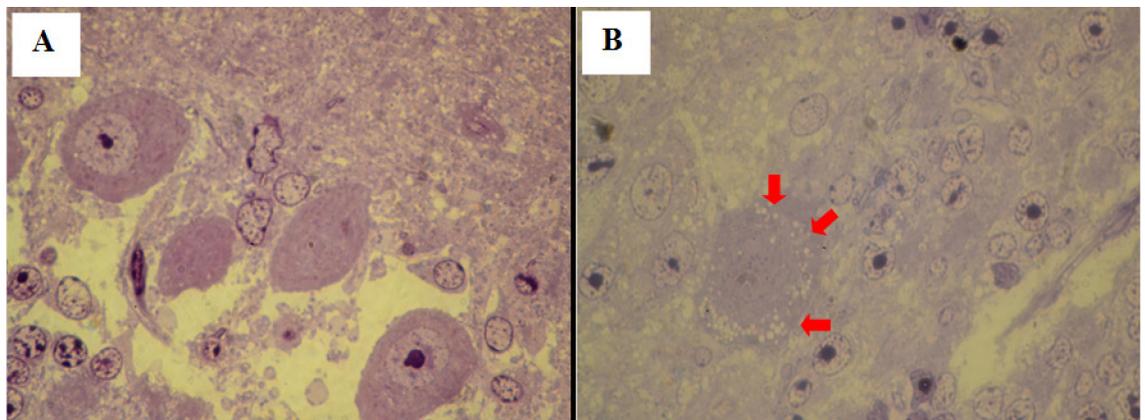
Hallazgos a la microscopía electrónica.

Cortes semifinos

En el procesamiento para la visualización en microscopia electrónica, se realizó previamente cortes semifinos de 1 μ m de espesor. Estos cortes se tiñeron con azul metileno y se observaron a través de microscopio óptico con el fin de evaluar la región de tallado final. A través de esta técnica se pudieron observar detalles histológicos que no eran posibles visualizar en los cortes de rutina de 5 μ m.

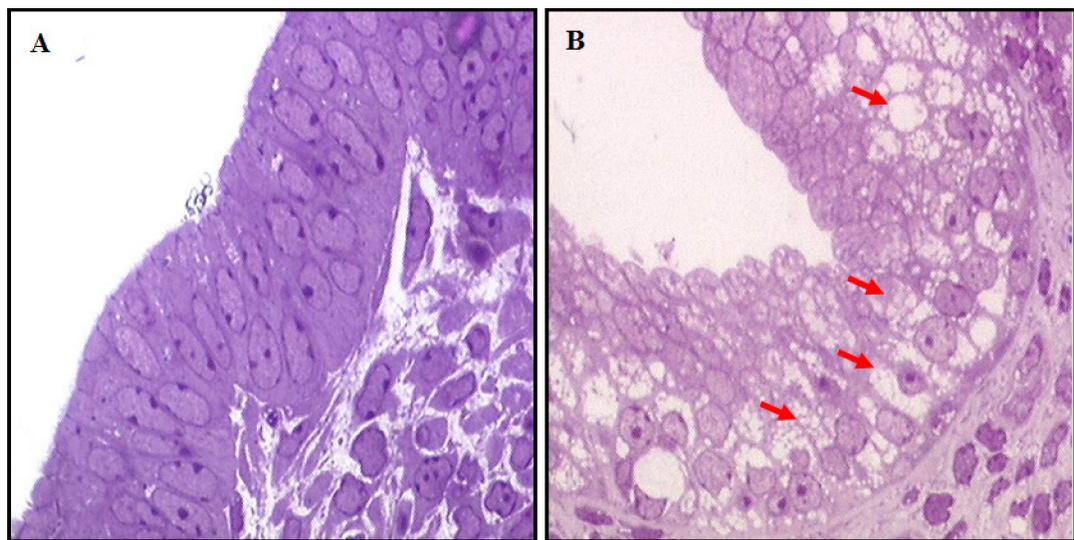
a-A nivel del cerebelo se aprecian con mayor detalle las vacuolas citoplasmáticas en las células de Purkinje de los cobayos del grupo tratado. En las muestras de los cobayos del grupo control las células de Purkinje y las células estrelladas se observaron con el citoplasma homogéneo y sin vacuolización (**Figura N° 2.12**).

Figura N° 2.12 (A) Células de Purkinje un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Obsérvese la leve vacuolización citoplasmática (flechas rojas). Secciones semifinas incluidas en resina. Tinción azul de metileno



b-En muestras de útero de los cobayos del grupo tratado, se apreció severa vacuolización que irrumpía el espacio citoplasmático y desplazaba el núcleo hacia la periferia. Se corroboró la distribución de la vacuolización en las células endometriales epiteliales y glandulares y miocitos del miometrio (**Figura N° 2.13**).

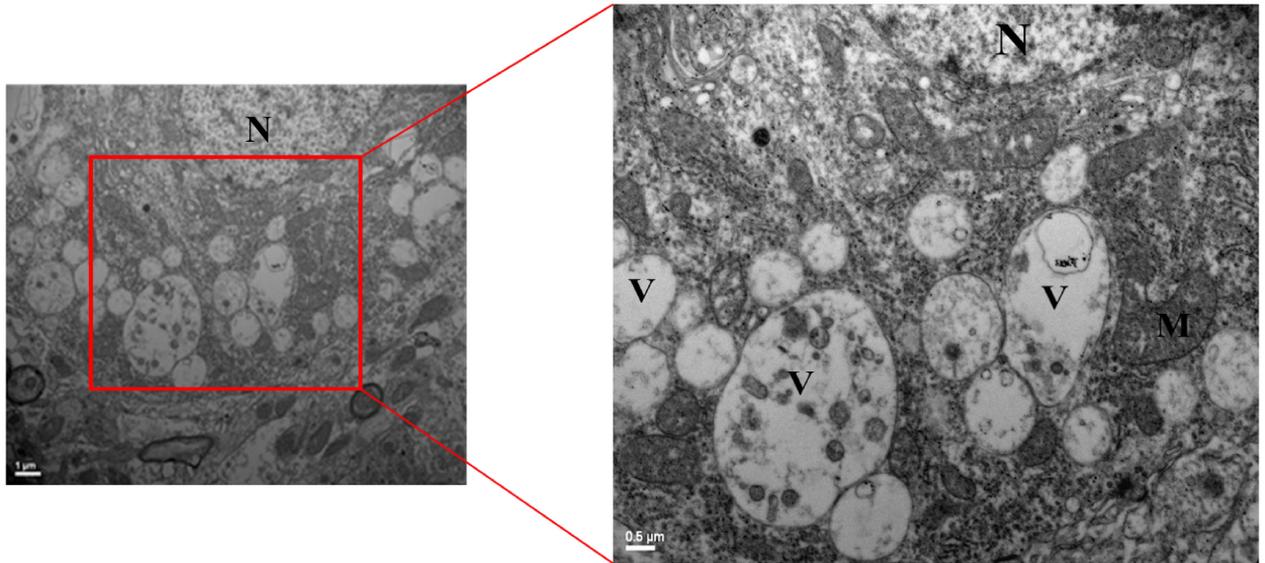
Figura N° 2.13 (A) Epitelio endometrial de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. Obsérvese la vacuolización citoplasmática en células epiteliales (flechas rojas). Secciones semifinas incluidas en resina. Tinción azul de metileno.



Cortes ultrafinos.

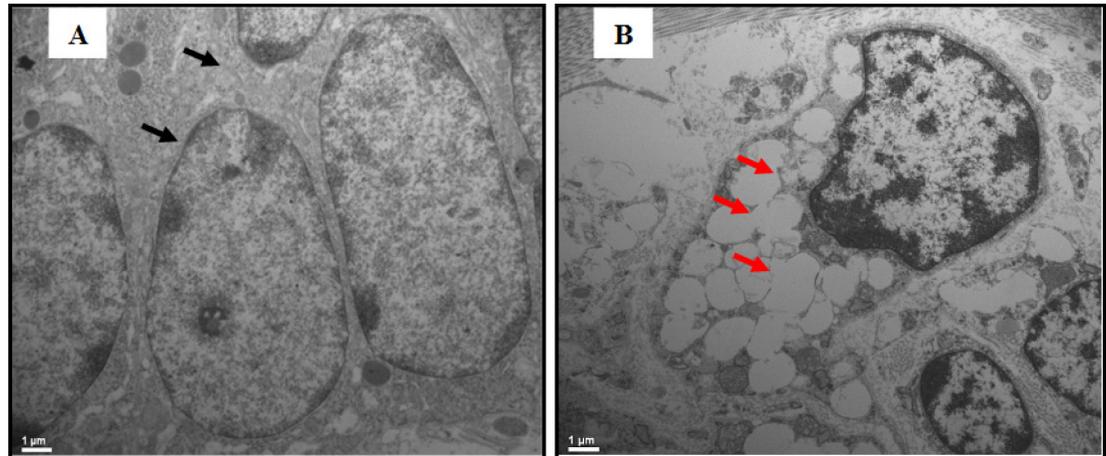
a-En las células de Purkinje, células de la granulosa y células de la glía del cerebelo de los cobayos tratados se observó que las vacuolas tenían un tamaño entre 1 y 6 μ m constituidas por una membrana simple. La mayoría de las vacuolas contenían material granuloso electrodensos en su interior correspondiente a fragmentos de membrana, sustancias amorfas o gránulos densos (**Figura N° 2.14**).

Figura N° 2.14 Célula de Purkinje de un cobayo del grupo tratado. Obsérvese la gran cantidad de vacuolas (V) citoplasmáticas de diversos tamaños y algunas con material granular en su interior. Tanto el núcleo (N) como las mitocondrias (M) se observan con su estructura normal. MET.



b-Ultraestructuralmente, en útero se observó que las vacuolas tenían un tamaño de 1-3 μ m constituidas por una membrana simple. La mayoría de las vacuolas estaban vacías, siendo la excepción el hallazgo de vacuolas que contenían material granuloso electrodenso en su interior. En algunas células, las vacuolas coalescen, deformando y marginando al núcleo hacia la periferia (**Figura N° 2.15**).

Figura N° 2.15 (A) Célula uterina del epitelio glandular de un cobayo del GC. Nótese la homogeneidad del citoplasma conteniendo escasos gránulos de secreción (flechas negras) y (B) de un cobayo del GT. Se aprecian vacuolas de membrana simple y con material granular electrodenso en su interior, deformando el núcleo (flechas rojas)



Resultados de la lectinhistoquímica.

Según el grado de lesiones observadas en el estudio histopatológico, se seleccionaron regiones encefálicas con mayor grado de lesión para el estudio de la distribución de compuestos glicosilados mediante la técnica de lectinhistoquímica. Estas regiones fueron: cerebelo y médula oblonga a la altura del óbex, estudiando diversos núcleos nerviosos y neuronas en particular.

En cerebelo se destacó una fuerte marcación con LCA y sWGA en células de Purkinje y núcleos profundos. Con la lectina WGA la marcación fue inconstante. La lectina Con-A arrojó una coloración de fondo muy intensa tanto en animales del grupo tratado como del grupo control.

En médula oblonga a la altura de óbex se observó una marcación dispar entre neuronas de diferentes núcleos encefálicos, correlacionado al grado de lesión observada por HE. Existen evidentes diferencias en la marcación de diversos grupos de neuronas. Como ejemplo: las neuronas extrapiramidales del núcleo reticular medular son fuertemente marcadas en su citoplasma con las lectinas afines a α -manosa y N-acetilglucosamina (LCA y sWGA) (**Figura N°**

2.16). En cambio las neuronas del núcleo hipoglosos presentan una marcación fuerte con las mismas lectinas, pero únicamente sobre del contorno vacuolar (**Figura N° 2.17**).

Figura N° 2.16 (A) Médula oblonga de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión fuerte y homogénea para la lectina LCA en neuronas extrapiramidales (círculo rojo). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.

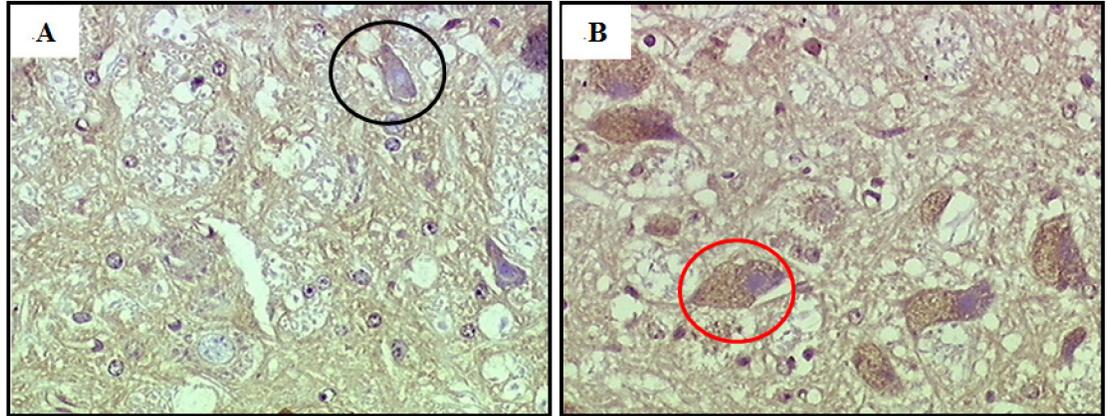
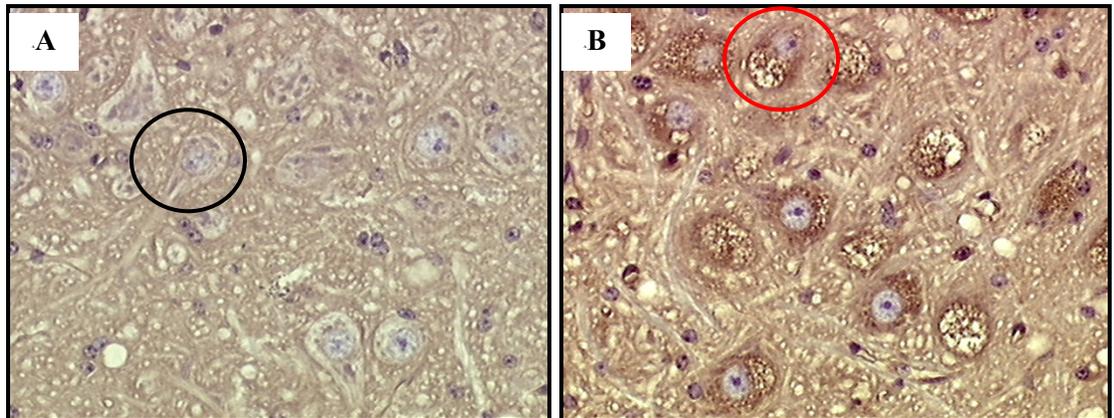


Figura N° 2.17 (A) Médula oblonga de un cobayo del GC y (B) un cobayo del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión fuerte para la lectina LCA continuando el contorno vacuolar en neuronas (círculo rojo). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.



Los resultados de la evaluación y semi-cuantificación del grado de marcación con las lectinas utilizadas en ambos grupos de cobayos se detallan en la **Tabla N° 2.5**.

Tabla N° 2.5 Promedio del grado de marcación de las lectinas. Se observan las diferencias en la marcación según área del SNC evaluadas para los dos grupos de cobayos.

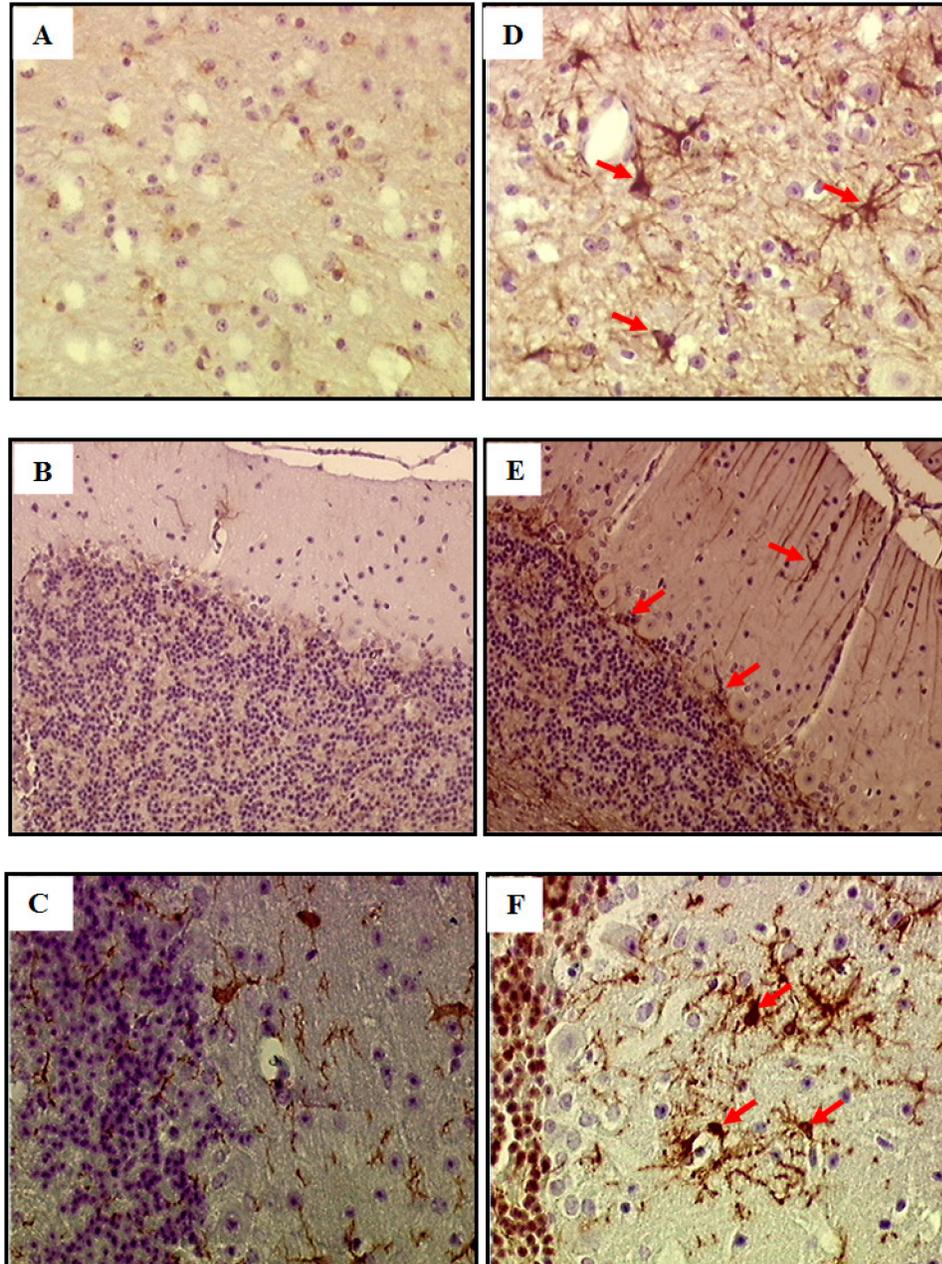
Lectina	Neuronas evaluadas	GC	GT
LCA	Células de Purkinje	+	+++
	Núcleo profundo del Cerebelo	-	++
	Núcleo Hipogloso	-	+++
	Núcleo Reticular Lateral	-	+++
sWGA	Células de Purkinje	-	-
	Núcleo profundo del Cerebelo	-	+++
	Núcleo Hipogloso	-	++
	Núcleo Reticular Lateral	-	++
WGA	Células de Purkinje	+	++
	Núcleo profundo del Cerebelo	-	++
	Núcleo Hipogloso	-	++
	Núcleo Reticular Lateral	-	++
Con-A	Células de Purkinje	++	+++
	Núcleo profundo del Cerebelo	++	++
	Núcleo Hipogloso	++	+++
	Núcleo Reticular Lateral	++	+++
PHAL	Células de Purkinje	- (§)	-
	Núcleo profundo del Cerebelo	- (§)	-
	Núcleo Hipogloso	- (§)	-
	Núcleo Reticular Lateral	- (§)	-
BS-1	Células de Purkinje	-	-
	Núcleo profundo del Cerebelo	-	-
	Núcleo Hipogloso	-	-
	Núcleo Reticular Lateral	-	-

Ref. (-) negativo; (+) suave; (++) moderado; (+++) fuerte. (§) sólo en el neuropilo.

Resultados de la inmunohistoquímica (IHQ).

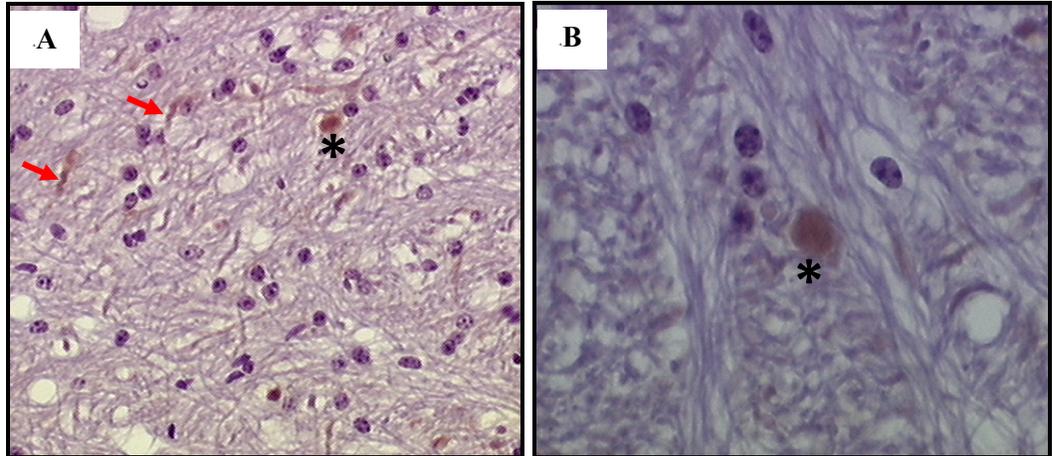
La IHQ del cerebelo en el grupo tratado reveló la presencia de reacción astrocitaria difusa (astrogliosis) evidente en sustancia blanca, en capa molecular y circundando las células de Purkinje con focos de microgliosis en la capa molecular. En los animales del grupo control no fueron observadas estas reacciones tisulares (**Figura N° 2.18**).

Figura N° 2.18 (A, B y C) Cerebelo de un cobayo del GC y (D, E y F) un cobayo del GT. (D) La marcación de color marrón representa la reacción positiva para GFAP en astrocitos (flechas) de la sustancia blanca de la base del cerebelo, (E) y en la capa molecular y cercano a las células de Purkinje (flechas), revelando astrogliosis. (F) Focos de microgliosis en capa molecular con la marcación de color marrón representa fuerte reacción positiva a Iba-1 en microglía (flechas). (A, B, C) La marcación leve correspondiente a un nivel basal en cobayos del grupo control. IHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.



La marcación de esferoides axonales, mediante el anticuerpo ubiquitina, fue suave y solo se identificaron en la base del cerebelo de animales del grupo tratado (**Figura N° 2.19**).

Figura N° 2.19 (A y B) Cerebelo de cobayo del grupo tratado. La marcación de color marrón pardo representa la reacción positiva para ubiquitina en un esferoide cortado transversalmente ubicado en la sustancia blanca de la base del cerebelo (asteriscos) y en axones dilatados cortados longitudinalmente (flechas rojas). IHQ. Método estreptavidina-biotina



4.3 DISCUSIÓN

La intoxicación experimental por *Astragalus pehuenches* se reprodujo en cobayos de manera exitosa mediante el protocolo propuesto. Con diferente grado de ponderación, los hallazgos en el estudio clínico, bioquímico e histopatológico determinaron la susceptibilidad del cobayo a la intoxicación por *Astragalus pehuenches*. Estudios anteriores describieron la susceptibilidad de esta especie ante la administración de swainsonina diluida en el agua de bebida u ofreciendo alimento compuesto por plantas del género *Ipomea spp* que contiene el alcaloide (Huxtable, 1969; Huxtable & Dorling, 1982; Cholich y col, 2009); sin embargo, el uso de extracto acuoso de la planta durante 30 días y la administración de swainsonina vía sondaje oral no ha permitido reproducir la enfermedad (Cholich, 2011).

La mayoría de los cambios clínicos observados en los animales intoxicados fueron inespecíficos como disminución del consumo, baja ganancia de peso, pérdida de condición corporal y la disminución en la actividad exploratoria; exceptuando las fasciculaciones y temores los cuales podrían deberse a la disfunción en la conducción del impulso nervioso a través de los axones alterados, lo cual fue observado a nivel histológico en forma de esferoides axonales ubicados en los núcleos *cuneiforme* y *gracilis* (Summer y col, 1995).

La disminución del consumo de alimento en los animales del grupo tratado observada en las primeras dos semanas se podría deber al cambio de alimento de balanceado comercial a *Locopellets*. Desde la cuarta semana se evidenció un tope del consumo en los animales del grupo intoxicado que fue de un 10-17% menor que el del grupo control. Este techo en el consumo coincidiría parcialmente con la hipótesis de que la swainsonina posee un efecto anoréxico (Pritchard y col, 1990).

En la prueba de campo abierto (*Open Field*) se observó una disminución de la actividad exploratoria medida en el número de cruces de cuadrantes y el tiempo que los animales permanecían inmóviles. Sin embargo, se presentó un patrón bifásico ya que en la tercer semana la actividad en ambos grupos se equiparó, luego a partir de la cuarta semana se evidenció una disminución en la actividad exploratoria en el grupo tratado que se acentuó al final del ensayo, como se mostró **Figura N° 2.1**. El patrón bifásico de híper/hipoactividad se ha documentado en otras enfermedades de almacenamiento lisosomal como la mucopolisacaridosis tipo IIIA (Bolivar y col, 2004), y neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Hemsley & Hopwood, 2005), donde los autores hipotetizan que se debe a que en los comienzos de la enfermedad se producen moderados niveles de disrupción en las sinapsis neuronales entre el cuerpo estriado y el hipocampo, expresado con hiperactividad; luego cuando el proceso de la enfermedad avanza las lesiones son mayores y el animal presenta una hipoactividad marcada.

A partir de la evaluación de la marcha (*FootPrint*) no se pudo determinar diferencias significativas entre los grupos. Llama la atención que a pesar de los evidentes hallazgos histopatológicos en médula oblonga y médula espinal, como los esferoides axonales y el daño neuronal en las α -neuronas, que determinan entre otras cosas alteraciones en la ejecución coordinada de los pasos (Summer y col, 1995), estas lesiones no se han podido traducir en cambios clínicos evaluado a través de la prueba de *FootPrint*. El hecho de no encontrar diferencias, estaría influenciado por la baja sensibilidad que tiene dicha prueba (Sedy y col, 2008). Cholich y col (2013) observaron en cobayos, un patrón similar al presente trabajo, utilizando plantas de *Ipomoea carnea* para reproducir experimentalmente la α -manosidosis. Sin embargo, este método se utilizó en cobayos con α -manosidosis congénita, obteniendo diferencias sólo en el ancho de los pasos en animales mayores de 3 meses y con enfermedad avanzada

(Robinson y col, 2008). El uso de pruebas neurocompartamentales automatizadas con análisis computarizados para la evaluación de los pasos, permiten detectar alteraciones del paso más sutiles en este tipo de enfermedades (Damme y col, 2012).

A nivel bioquímico, en animales del grupo tratado se encontraron niveles de AST nueve veces superiores al valor de referencia. Esto fue adjudicado a la alteración tisular observada a nivel hepático. La diferencia en el valor de la enzima CPK entre los grupos podría deberse al grado de actividad muscular de los animales observadas en el campo abierto (D'Ottavio y col, 2008). Los datos obtenidos coinciden con Stegelmeier y col, (1995) quienes sugieren que el dosaje enzimático posee baja significancia diagnóstica para las α -manosidosis adquiridas en animales de producción.

Por el contrario a los resultados enzimáticos, la determinación de oligosacáridos en orina sí resultó una metodología de utilidad para ser aplicada en la caracterización de la intoxicación ya que permitió determinar el momento en que los animales comenzaron a excretar oligosacáridos. Además, por su alta sensibilidad y especificidad permitió diferenciar de forma segura entre animales intoxicados y no intoxicados ya que en todos los animales tratados se observaron bandas de excreción, cosa que no ocurrió en los animales del grupo control. Los resultados coinciden con lo publicado anteriormente en cobayos y otros modelos animales donde se utilizaron otras especies de plantas con swainsonina (Abraham y col, 1983; Warren y col, 1988; Bedin y col, 2009).

El cuadro histopatológico observado es semejante a trabajos previos realizados en cobayos con α -manosidosis congénita (Aucleair y col 2007), intoxicados con *Ipomoea carnea* (Cholich y col 2009 y 2013) y con swainsonina pura (Huxtable y col 1982), en ratas intoxicadas con dosis altas de swainsonina (Stelgemeier y col, 2008) y ratones modificados genéticamente

para la expresión de la enfermedad (Damme y col, 2012). Esto corrobora que el uso de cobayos reproduce satisfactoriamente el cuadro histopatológico mediante el consumo voluntario de la planta (Huxtable 1969; Cholich y col, 2009), constituyendo el modelo con mayor grado de similitud respecto a las intoxicaciones espontaneas ocurridas en animales de producción (Tokarnia y col, 2012).

En los órganos viscerales se encontró vacuolización en hígado y riñón coincidiendo con lo hallado por otros autores (Huxtable, 1969; Stegelmeier y col, 1995). Sin embargo, como hallazgo novedoso son las lesiones encontradas a nivel de órganos reproductivos, precisamente en el útero. Si bien el aspecto reproductivo de la intoxicación ha sido estudiado a nivel placentario (Armien y col, 2011), por sus efectos estrogénicos (James y col, 1972), abortigénicos (van Kampen y col, 1971), y teratogénicos (James, 1975), el útero no había sido producto de estudio con anterioridad al presente trabajo. Las lesiones caracterizadas por vacuolización fueron observadas en epitelio uterino, células epiteliales de la glándula endometrial y miometrio. Como es sabido, el útero tiene implicancia a lo largo de todo el período gestacional tanto en la implantación embrionaria, en el desarrollo placentario y luego en la expulsión del feto. En los cobayos del grupo tratado fueron observados, mediante microscopia óptica y electrónica, modificaciones morfo-funcionales. Estas modificaciones podrían alterar el normal desarrollo y desenlace de la gestación, que podrían explicar un porcentaje de las perdidas gestacionales que son imputadas en la intoxicación por plantas con swainsonina (James y col, 1972).

Como demuestra la **Tabla N° 2.4**, la lesión vacuolar se observó en la mayoría de los núcleos nerviosos y neuronas del SNC estudiados. Sin embargo, hubo diferencias en el patrón de las lesiones en forma de burbujas que disrumpe el citoplasma y la vacuolización fina que desplaza el núcleo hacia la periferia. La clasificación de estos dos tipos de vacuolización fue

anteriormente descrita por Huxtable (1969). La diferencia en el patrón del daño neuronal, corroborada en este trabajo, suma evidencia a la hipótesis planteada por diversos autores que postulan que existe una mayor susceptibilidad de las neuronas GABAérgicas ante la acción de la swainsonina (Walkley y col, 1991, Stegelmeier y col, 1995).

Si bien la vacuolización fue generalizada y observada en prácticamente todos los grupos neuronales, fue más severa en el núcleo hipogloso y núcleos profundos del cerebelo. Esto coincide con lo descrito por Huxtable (1969) y Cholich y col (2013) quienes observaron que la lesión de vacuolización se produce en forma más exacerbada en neuronas de núcleos del tallo encefálico particularmente el núcleo hipogloso y las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo.

Mediante lectinhistoquímica se pudo confirmar que el consumo prolongado de *Astragalus pehuenches* produce una enfermedad de almacenamiento lisosomal caracterizada por la acumulación de oligosacáridos ricos en manosa y N-acetilglucosamina. Esto coincide con lo descrito por Alroy y col (1985) quienes evaluaron muestras de animales con α -manosidosis congénita y adquirida. Sin embargo, se aprecian diferentes grados de marcación dependiendo de la célula evaluada y la lectina utilizada (Tabla N° 2.5). En el caso de las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo, núcleo hipogloso y del núcleo reticular lateral las diferencias en la marcación con lectinas LCA, sWGA o WGA permitió asegurar el diagnóstico en un animal intoxicado. En el caso de las células de Purkinje de los animales controles se observó una tenue marcación con las lectinas LCA y WGA, lo que dificultaría la diferenciación entre animales enfermos y sanos. El uso de la lectina Con-A es ampliamente utilizado para la caracterización de α -manosidosis adquirida y genética (Alroy y col, 1985). Driemeier y col (2000) la utilizó en caprinos intoxicados por *Sida carpinifolia* en caprinos, dando diferencias en la marcación entre

animales intoxicados y los sanos. En este trabajo la marcación con Con-A fue similar entre los cobayos intoxicados por *Astragalus pehuenches* y los cobayos controles, determinando la baja utilidad de esta lectina para la caracterización de esta intoxicación en cobayos.

En la inmunohistoquímica se observó un aumento en la expresión de GFAP, principalmente en sustancia blanca y en vecindad de las células de Purkinje lo cual determina que las lesiones neuronales observadas al microscopio óptico, promueven la activación astrocitaria en el tejido nervioso dañado (Petzold y col, 2002). La activación de la microglía observado en este trabajo coincide con Jeyakumar y col (2003) quienes documentaron el mismo proceso microglial en otras enfermedades lisosomales como la gangliosidosis tipo GM1 y GM2. En el caso de la α -manosidosis se sospecha que esta activación está gatillada por la cantidad de material acumulado rico en manosa (Damme y col 2012). En conjunto estos resultados sugieren que el cerebelo sufre una serie de lesiones neuronales que afectarían su funcionalidad.

5 CAPITULO III

“CARACTERIZAR LA INTOXICACIÓN POR CONSUMO DE *Astragalus pehuenches* EN OVINOS”

5.1 MATERIALES Y METODOS

5.1.1 Diseño experimental

Se utilizaron 8 ovinos hembras raza Merino de 15 meses de edad con un peso promedio de 31,5 kg. Los animales se alojaron individualmente en corrales con piso de material de 8,75 m² y paredes de chapas galvanizadas. Las instalaciones están ubicadas en la EEA INTA Bariloche (41°07'24''S; 71°14'58''O; 790 msnm). Los animales fueron provistos por un establecimiento cercano a la localidad de Pilcaniyeu y nunca tuvieron acceso al consumo de *Astragalus pehuenches*.

Protocolo de intoxicación

Luego de un período de acostumbramiento de dos semanas que consistió en la adaptación de los animales en los corrales y alimentación con pellets de alfalfa, se procedió al inicio del protocolo de intoxicación. Durante 54 días, según grupo se administró diariamente “Locopellets”^(*) al grupo tratado (GT, n=5) y alimento balanceado comercial al grupo control (GC, n=3). El polvo de planta utilizado para este ensayo correspondió al cosechado en el año 2013, siendo la concentración de swainsonina (SW) de 0,097% (ref. Capítulo I, pág.31). La cantidad de *Locopellets* administrado se calculó según peso del animal con el objetivo de alcanzar una dosis diaria de 2mgSW/kg/PV. Para satisfacer los requerimientos diarios se administró pellets de

* Locopellets: Alimento compuesto por 67% de polvo de alimento balanceado comercial (Balansur ®) y 33% de polvo de *Astragalus pehuenches*, reconstituído en forma de pellet.

alfalfa hasta equiparar el gasto energético de mantenimiento. La dieta completa representó el 2,3% kgPV/día.

Para medir el consumo se calculó la diferencia entre el alimento ofrecido y el remanente no comido, pesado con balanza electrónica. El agua de bebida fue suministrada *ad libitum*. Al inicio del día se ofrecía la cantidad de *Locopellets* requeridos para alcanzar la dosis de SW propuesta; una vez que los animales habían ingerido el total del tóxico suministrado se ofreció pellets de alfalfa con la cantidad restante hasta cubrir los requerimientos diarios de mantenimiento. A lo largo de todo el protocolo, este procedimiento se realizó siempre comenzando por los animales del grupo tratado y luego con los del grupo control. En el caso de que los animales del grupo tratado no consumiesen el total del *Locopellets* ofrecido no se los alimentaba con pellets de alfalfa, y a los animales del grupo control se restringía la cantidad de balanceado para equiparar el consumo y anular el efecto del “*no consumo*” en el grupo tratado.

Todos los experimentos con animales fueron evaluados y aprobados con N° de protocolo 20-1-11, por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

5.1.2 Estudios clínicos

En los dos grupos se registró diariamente el consumo de alimento y en forma semanal se registró el peso vivo, estado clínico general y condición corporal utilizando la escala de 1 a 5 (Jefferies, 1961). Semanalmente los animales de ambos grupos se evaluaron neurocomportamentalmente mediante las siguientes pruebas semiológicas:

5.1.2.1 Prueba de actividad a campo abierto (Open Field).

Este test consiste en colocar individualmente a los animales dentro de un área de 3,6 x 4,2 m el cual posee la base de madera antideslizante dividida en 25 cuadrantes simétricos. La duración de la evaluación es de 10 minutos y se contabilizan: las veces que el animal cruza cada cuadrante, el número de intentos de retirada (atropelladas o cuando el animal se mantiene sobre los miembros traseros apoyándose sobre la pared del campo), el número de balidos y mediante cronómetro se determina el tiempo de inmovilidad. El registro es realizado por dos operarios y luego se promedian las observaciones (Robinson y col, 2008; Villalba y col, 2009).

5.1.2.2 Evaluación del paso (Pasarela).

Para evaluar el movimiento del paso, los animales eran observados mientras caminaban sobre un área de 6 m de largo x 0,6 m de ancho con piso de concreto. Se definió como anormal al paso que en su realización presentase alguna modificación como envaramiento, hipermetría y/o tropiezo.

5.1.2.3 Prueba de Romberg.

Esta maniobra se fundamenta en que a través del vendaje de los ojos y así la abolición del sentido de la vista, se puede diferenciar si la falla de coordinación del paso es debido a un síndrome cerebeloso o de las vías propioceptivas (funículos dorsales de la médula espinal) (Pearse, 2005). Un animal con signo de Romberg positivo aquel que, con los ojos vendados, se exacerban las respuestas atáxicas y desequilibrio, confirmando así la lesión de las vías propioceptivas medulares.

5.1.2.4 Prueba del levantamiento de la cabeza (Head Raising).

Se estableció la maniobra semiológica sugerida por Pienaar y col (1976) para ser utilizada como diagnóstico clínico de enfermedad cerebelosa. Brevemente la misma consistió en: con el animal en estación se sobre-extiende la cabeza en 90° hacia arriba hasta que la base del cráneo toque la espalda torácica, en esa posición se deja al animal por 60 segundos para luego soltar súbitamente la cabeza y observar el comportamiento ambulatorio del animal. En casos de degeneración cerebelosa, los animales son positivos a esta prueba.

Para cuantificar la respuesta, la observación fue categorizada en 4 grados: 0=sin reacción; 1=ambulacion con algún grado de incoordinación; 2=caída y reincorporación en menos de 30 segundos; 3=Caída sin reincorporación.

Las observaciones clínicas de campo abierto, pasarela, prueba de Romberg y la prueba del levantamiento de la cabeza, fueron filmadas mediante una video cámara digital (Sanyo® 2006) y observadas en su totalidad al finalizar el ensayo.

5.1.3 Estudios bioquímicos

5.1.3.1 Sangre

Con frecuencia semanal se extrajo sangre mediante la punción de la vena yugular. Se utilizó el sistema Vacutainer®, con tubos heparinizados con 400UI de heparina. Inmediatamente luego de la extracción la sangre se procesó para la obtención de plasma. El plasma fue conservado a -20°C hasta su análisis.

Perfil sérico de enzimas.

Las enzimas evaluadas fueron alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatina fosfoquinasa (CPK). Estas enzimas se evaluaron en ambos grupos en cuatro momentos del ensayo: Semana 0, Semana 3, Semana 6 y Semana 8.

Determinación del intervalo de referencia para la actividad α -manosidasa.

Para determinar el valor de referencia de la actividad de la α -manosidasa plasmática en ovinos, se estableció el intervalo de referencia (IR) utilizándose 15 animales de similares características en sexo, raza, edad y un ambiente similar al de lo utilizados en el ensayo experimental.

Tanto para la determinación del IR como para los análisis de α -manosidasa en los animales en ensayo se utilizó el método de dosaje enzimático en muestras de plasma.

Actividad enzimática de α -manosidasa en plasma.

Ídem para la determinación de la actividad enzimática en cobayos (ref. Capítulo II, pág.38).

5.1.3.2 Orina

Con frecuencia diaria hasta el día 15 de intoxicación y luego en forma semanal, la orina fue obtenida mediante jeringa a partir de micciones pasivas de los animales sobre piso de concreto limpio. Cuando no se lograba la micción pasiva se utilizó el reflejo de apnea. La orina recolectada fue colocada en tubos Eppendorfs y almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

Determinación de oligosacáridos (OLS).

Ídem para la determinación de oligosacáridos en cobayos (ref. Capítulo II, pág.39).

5.1.4 Estudios patológicos

En el día 54 los animales fueron eutanasiados previa anestesia con 0,2 mg/Kg de acepromazina y 0,05 mg/Kg de xilacina mediante exanguinación. Luego se realizó la necropsia evaluando alteraciones macroscópicas y se obtuvieron muestras de sistema nervioso central (SNC), hígado, riñón y útero. Todas las muestras obtenidas se colocaron en formol bufferado al

10% por 48hs, excepto el SNC el cual fue fijado por 7 días. Pasado el periodo de fijación se trasvasaron a alcohol 70° hasta su inclusión en parafina. En el caso del SNC este período no excedió los 5 días según recomendaciones de Fix & Garman (2000).

Para la evaluación histopatológica del SNC se realizaron cortes obteniendo secciones coronales determinadas según regiones y núcleos encefálicos seleccionados para su estudio (Peters, 2002).

5.1.4.1 Tinción de hematoxilina y eosina (HE)

Ídem para cobayos (ref. Capítulo II, pág.42)

5.1.4.2 Técnica de microscopia electrónica de transmisión (MET).

Ídem para cobayos (ref. Capítulo II, pág.42)

5.1.4.3 Técnica de lectinohistoquímica (LHQ).

Para establecer el patrón de distribución de los carbohidratos almacenados en las células del SNC, se realizó una técnica de lectinohistoquímica sobre tejidos previamente fijados, parafinados y cortados a 5µm. Los cortes fueron incubados con cuatro lectinas con una concentración de 30µg/ml, según se detalla en la **Tabla N° 3.1**. Los cortes se clasificaron según la intensidad de coloración en nulo (-), pobre (+), moderado (++) y fuerte (+++). Como sistema de detección se utilizó el método basado en Estreptavidina-Biotina (Dako, Carpintería, CA). Como cromógeno se utilizó 3,3'diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB) (Dako, Carpintería, CA). Se utilizó hematoxilina de Harris como coloración de contraste.

Tabla N° 3.1 Lectinas empleadas sobre muestras de SNC con su nombre completo y acrónimos, especificando los carbohidratos a las cuales son afines.

Lectina	Acronimia	Afinidad
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNAc; NeuNAc
<i>Succinil-WGA</i>	sWGA	(α -(1-4)-D- GlcNAc) ₂
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	β -D-Man; α -D-Glc
<i>Lens culinary</i>	LCA	α -Glc, α -D-Man

5.1.5 Análisis estadístico de los resultados

Los datos recolectados de cada observación fueron volcados en planilla de cálculos (Microsoft Excel®). Para las variables consumo diario, peso vivo, condición corporal, cruces de cuadrantes e inmovilidad en campo abierto, actividad de α -manosidasa y perfil enzimático clínico se realizaron evaluaciones *a priori* para determinar el modelo de covarianzas. Una vez establecido el modelo, se compararon las medias de los grupos mediante un modelo de medidas repetidas en el tiempo mediante el Proc Mixed SAS®. Valores de $p < 0,05$ se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Hallazgos clínicos

En el período de intoxicación los animales de ambos grupos no presentaron cambios en el comportamiento, aspecto general de la lana como tampoco en la consistencia de la materia fecal. Los animales de ambos grupos se mantuvieron atentos y vigorosos durante todo el ensayo.

En la primera semana del ensayo se registró una disminución abrupta del consumo de *Locopellets* por parte del grupo tratado, pero a partir de la segunda semana se recuperaron hasta llegar a los valores normales de consumo. Luego de este período los animales consumieron todo el alimento ofrecido, manteniéndose así en ambos grupos hasta el final del ensayo sin observarse diferencias debido al tratamiento ($p=0,91$).

Durante el ensayo el comportamiento del consumo fue modificándose, observando diferentes patrones individuales de cada animal del grupo tratado. Por ejemplo, un animal desde el comienzo del ensayo consumió todos los *Locopellets* ofrecidos sin presentar selectividad del alimento; otro animal demoró 5 días en comer todos los *Locopellets* ofrecidos y su selectividad se mantuvo hasta la cuarta semana del ensayo. En general en las primeras tres semanas del ensayo, los animales demoraban entre 60 y 120 minutos en consumir los *Locopellets*. Con el transcurso del ensayo, el consumo de *Locopellets* era más rápido demorando menos de 5 minutos en las últimas semanas.

Tanto en el peso vivo ($p=0,59$) como en la condición corporal ($p=0,28$) no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (**Tabla N°3.2**).

Tabla Nº3.2 Evolución semanal del promedio del peso vivo y condición corporal y los desvío estándar correspondiente a cada variable (entre paréntesis) en ambos grupos del ensayo.

	Semana de ensayo																	
	Sem0		Sem1		Sem2		Sem3		Sem4		Sem5		Sem6		Sem7		Sem8	
	kg	CC	kg	CC	kg	CC	kg	CC	kg	CC	kg	CC	kg	CC	kg	CC	kg	CC
GC	30 (3,8)	2,5 (0,2)	29,4 (4,1)	2,4 (0,1)	29,6 (4,5)	2,3 (0,1)	29,7 (4,3)	2,3 (0,1)	29,9 (4,5)	2,4 (0,2)	30 (4,3)	2,5 (0,1)	30,4 (4)	2,5 (0,2)	30,4 (4,0)	2,5 (0,2)	30,2 (4,0)	2,6 (0,1)
GT	31,4 (1,6)	2,6 (0,1)	31,4 (1,2)	2,4 (0,1)	30,4 (1,0)	2,2 (0,1)	31,2 (1,1)	2,4 (0,1)	31,7 (1,5)	2,6 (0,1)	31,6 (1,3)	2,4 (0,1)	31,5 (1,4)	2,3 (0,1)	31,6 (1,6)	2,3 (0,1)	31,4 (1,1)	2,4 (0,1)

Prueba de actividad del campo abierto (evaluación del comportamiento).

No se observaron diferencias entre grupos en la actividad exploratoria medida por la cantidad de cruces de cuadrantes a lo largo del ensayo ($p=0,054$). Sin embargo, se observaron diferencias entre grupos en el tiempo que permanecían inmóviles ($p<0,05$). Es así que a partir de la segunda semana y hasta el final del ensayo el grupo tratado permanecía más tiempo inmóvil que el control.

5.2.1.1 Pasarela (evaluación de la marcha).

A partir de la 3^{ra} semana de intoxicación se observó en el grupo tratado un cambio en la ejecución del paso de los miembros anteriores. Estos cambios consistieron en una hipermetría caracterizada por un aumento de la distancia de alzada, recorrido más lento y parabólico del paso. Los animales del grupo tratado presentaron hipermetría con tropiezos esporádicos sin ocasionar caídas. En la realización de la prueba, la posición de la cabeza se mantuvo erguida.

5.2.1.2 Prueba de Romberg.

En forma progresiva a la intoxicación, en los animales tratados se evidenció la disminución en la ambulación voluntaria, con momentos en que algunos animales permanecían

estancos y con posturas anómalas como por ejemplo aumento de la base de sustentación, cruzamiento de miembros anteriores y desvío axial del punto de equilibrio.

5.2.1.3 Prueba del levantamiento de la cabeza (*Head Raising*)

De manera general, los animales tratados presentaron una leve alteración en la ambulación a partir de la segunda semana del ensayo y ocasionalmente presentaron caídas con recuperación en menos de 5 segundos (**Tabla N°3.3**).

Tabla N°3.3 Evolución semanal de la respuesta a la prueba de levantamiento de la cabeza en ambos grupos del ensayo.

Ovino	Grupo	Semana de ensayo								
		Sem0	Sem1	Sem2	Sem3	Sem4	Sem5	Sem6	Sem7	Sem8
1	GT	0	0	2	1	1	0	1	0	1
2		0	0	0	1	0	1	1	0	1
3		0	1	1	0	1	1	0	1	0
4		0	0	1	1	1	1	0	2	1
5		0	0	0	1	0	0	1	1	0
6	GC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7		0	1	0	0	0	0	0	0	0
8		0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ref.: 0=sin reacción; 1=ambulación con algún grado de incoordinación; 2=caída y reincorporación en menos de 30 segundos; 3=Caída sin reincorporación.

5.2.2 Hallazgos bioquímicos

5.2.2.1 Perfil enzimático

La alanina aminotransferasa (ALT) tiene localización citosólica en hepatocitos y se la clasifica dentro de las enzimas de derrame porque se libera luego de una lesión difusa aguda del órgano, reflejándose en un aumento de su concentración en plasma. En este caso no se observaron variaciones entre los grupos tratado y control durante el periodo de ensayo ($p=0,144$).

Otra enzima de derrame evaluada fue la aspartato aminotransferasa (AST) que es una enzima de localización citosólica y mitocondrial. Si bien esta enzima tiene amplia distribución en el organismo, predomina en hígado y músculo esquelético. En el grupo tratado, a partir de la 3^{ra}

semana y hasta el final del ensayo los valores de esta enzima fueron significativamente superiores respecto al grupo control ($p < 0,05$).

La CPK de localización exclusiva en el tejido muscular fue utilizada para descartar daño muscular. Los valores obtenidos en esta enzima fueron variables a lo largo del ensayo, sin embargo nunca superaron los niveles de referencia y no se registraron diferencias entre grupos ($p = 0,392$) (**Tabla N° 3.4**).

Tabla N° 3.4 Valores promedio y desvío estándar (\pm DE) de los niveles de enzimas séricas evaluadas en ambos grupos experimentales de ovinos en cuatro momentos del ensayo.

Enzima	Grupo Control				Grupo Tratado			
	S_0	S_3	S_6	S_8	S_0	S_3	S_6	S_8
ALT	9,6 \pm 2,0	8,7 \pm 2,5	8,7 \pm 1,5	11 \pm 4,3	11,2 \pm 0,8	13,2 \pm 1,9	13,4 \pm 3,0	12,8 \pm 3,0
AST	55 \pm 8,6	50 \pm 7,9	41 \pm 5,3	59,3 \pm 24,3	51 \pm 8,6	197 \pm57,9*	201 \pm35,9*	206 \pm60,6*
CPK	237 \pm 121,9	390 \pm 482	55 \pm 12,1	105,3 \pm 67,3	141 \pm 111,0	170 \pm 161,7	90,6 \pm 15,7	126 \pm 107,8

Ref.: S_0 ; S_3 ; S_n ...semana de intoxicación. () Diferencias significativas entre grupos.*

Actividad enzimática de α -manosidasa en plasma.

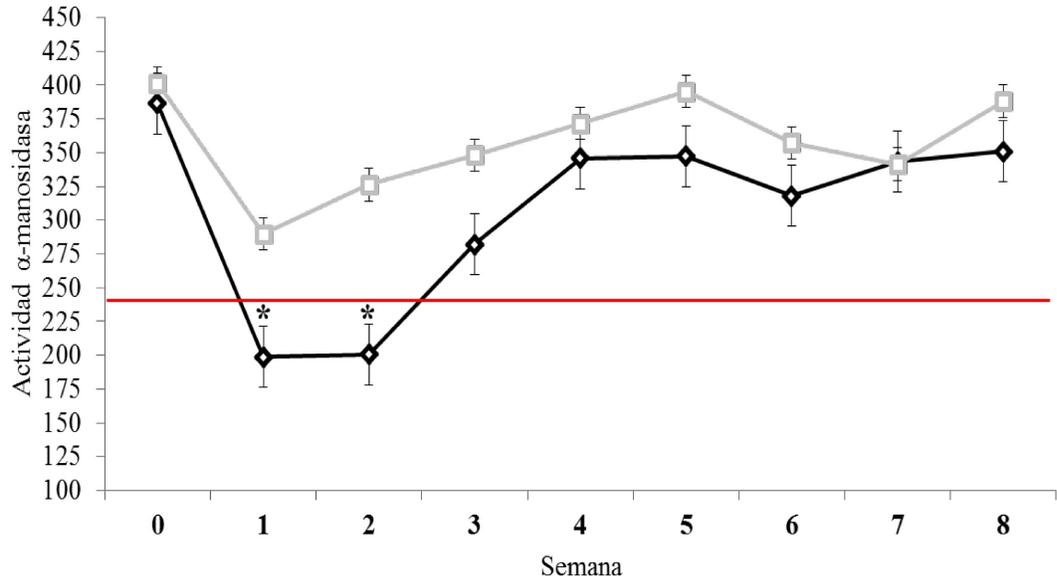
En la **Tabla N° 3.5** se observan los valores individuales de los 15 animales para determinar el intervalo de referencia (IR) de la actividad de la α -manosidasa plasmática en ovinos.

Tabla N° 3.5 Intervalo de referencia (IR) para la actividad de la enzima α -manosidasa plasmática en ovinos.

Animal	Actividad α -manosidasa
C1	306,5
C2	327,0
C3	435,6
C4	520,4
C5	294,9
C6	326,4
C7	293,5
C8	455,9
C9	348,9
C10	377,6
C11	319,7
C12	375,2
C13	356,1
C14	358,7
C15	428,1
Promedio	368,3
DE	65,6
IR	237,1 - 499,5

En el comienzo del ensayo tanto los animales del grupo control como los del grupo tratado, presentaron valores de α -manosidasa plasmática entre los valores de referencia calculados (IR). En la primera y segunda semana del ensayo se observó, en los animales tratados una disminución de la actividad enzimática, resultando estadísticamente significativa con respecto al grupo control tal como puede observarse en la **Figura N°3.1**.

Figura N° 3.1 Actividad de la enzima α -manosidasa plasmática a lo largo del ensayo. La línea negra representa el promedio y desvío estándar (\pm DE) de los valores de actividad en los ovinos del GT. La línea gris representa el promedio y desvío estándar (\pm DE) de los valores de actividad en los ovinos del GC. La línea roja representa el límite inferior del intervalo de referencia calculado.



Ref. (*): Valores con diferencias significativas entre grupos.

Con el fin de evaluar la especificidad de la acción de la swainsonina sobre las enzimas lisosomales se midió la actividad enzimática de β -galactosidasa no encontrándose diferencias entre los grupos ($p=0,33$).

5.2.2.2 Hallazgos en orina

En los animales tratados se observó la excreción de oligosacáridos (OLG) en orina, a partir del 2^{do}, 4^{to} y 8^{vo} día de intoxicación según animal. En algunos animales se identificaron tres bandas correspondientes a tres OLG diferentes. En todos los casos la excreción se mantuvo hasta la semana de sacrificio. La observación de las bandas es de carácter cualitativo, sin embargo se apreció una coloración mayor a medida que avanzaban las semanas de intoxicación (**Figura N°**

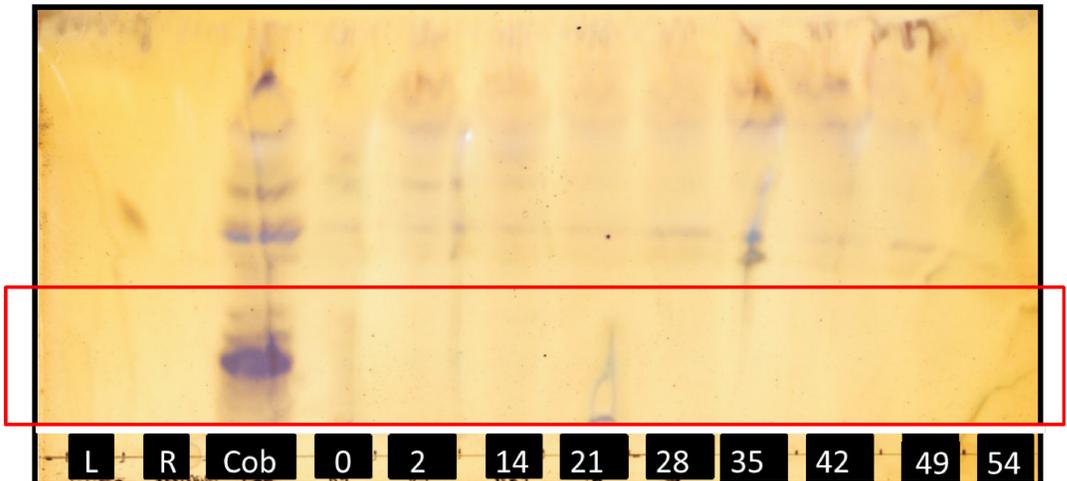
3.2). En los animales del grupo control no se observó ninguna banda correspondiente a oligosacáridos a lo largo del ensayo (**Figura N° 3.3**).

Figura N° 3.2 Placa de cromatografía delgada de la orina de un ovino del GT recolectada en el periodo de ensayo. El recuadro rojo marca la zona donde se observan las bandas correspondientes a OLG.



*Ref.: R: Rafinosa; L: Lactosa-azúcares utilizados como patrones-; Cob: Cobayo intoxicado(control positivo).
Los números en el borde inferior indican los días de intoxicación.*

Figura N° 3.3 Placa de cromatografía delgada de la orina de un ovino del GC recolectada en el periodo de ensayo. El recuadro rojo marca la zona donde debieran observarse las bandas correspondientes a los OLG.



*Ref.: R: Rafinosa; L: Lactosa-azúcares utilizados como patrones-; Cob: Cobayo intoxicado(control positivo).
Los números en el borde inferior indican los días de intoxicación.*

5.2.3 Hallazgos patológicos

Hallazgos macroscópicos

A la necropsia se pudo comprobar la óptima condición corporal por la presencia de abundante depósito de grasa subcutánea, perirrenal y epicárdica en ambos grupos. En ningún animal se observaron alteraciones en tamaño, color y consistencia de los órganos viscerales.

Hallazgos microscópicos.

a) *Sistema nervioso central*

En los ovinos del grupo tratado el principal hallazgo fue la degeneración neuronal caracterizada por vacuolización, cromatólisis y desplazamiento del núcleo hacia la periferia.

El grado de vacuolización varió de leve, moderado y severo según animal, región encefálica, núcleo encefálico y tipo de neurona. Las neuronas con vacuolización más severa fueron las células de Purkinje y las neuronas de la corteza motriz. En los ovinos del grupo control no se observaron lesiones (**Tabla N° 3.6**).

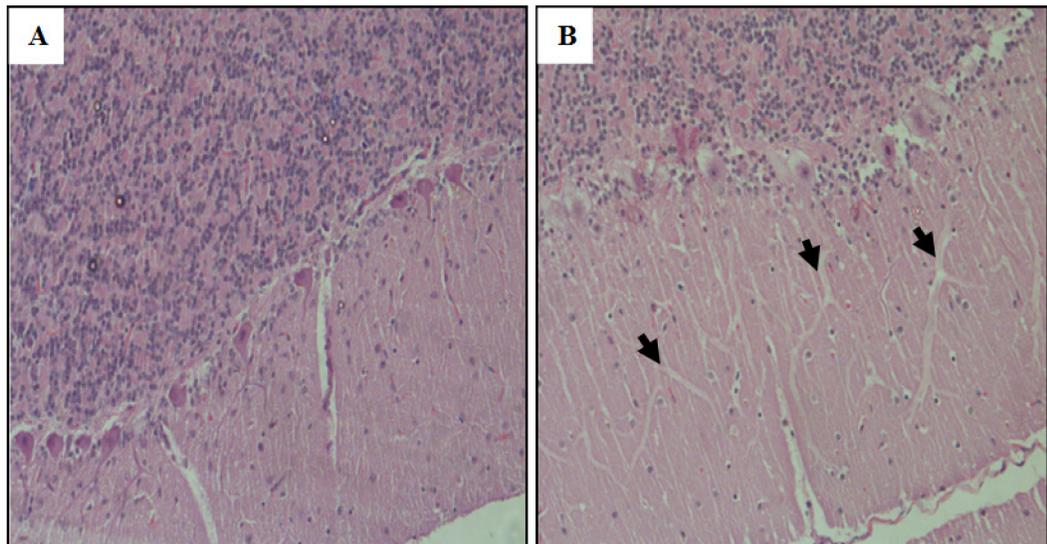
Tabla N° 3.6 Promedio del grado de vacuolización citoplasmática observada en diferentes áreas del SNC para ambos grupos ovinos.

Sistema Nervioso Central	Grupo	
	GC (n=3)	GT (n=5)
Células de Purkinje	0	2.60
Núcleo profundo del Cerebelo	0	2.20
Corteza motriz	0	2.40
Núcleo <i>gracilis</i>	0	2.00
Núcleo cuneiforme	0	1.75
Núcleo hipogloso	0	2.00
N. dorsal del Vago	0	1.25
Núcleo reticular lateral	0	1.75
Núcleo reticular medular	0	2.00
Asta ventral de médula espinal	0	1.60

Ref.: Escala de 0: sin lesión; 1: leve; 2: moderada; y 3: severa.

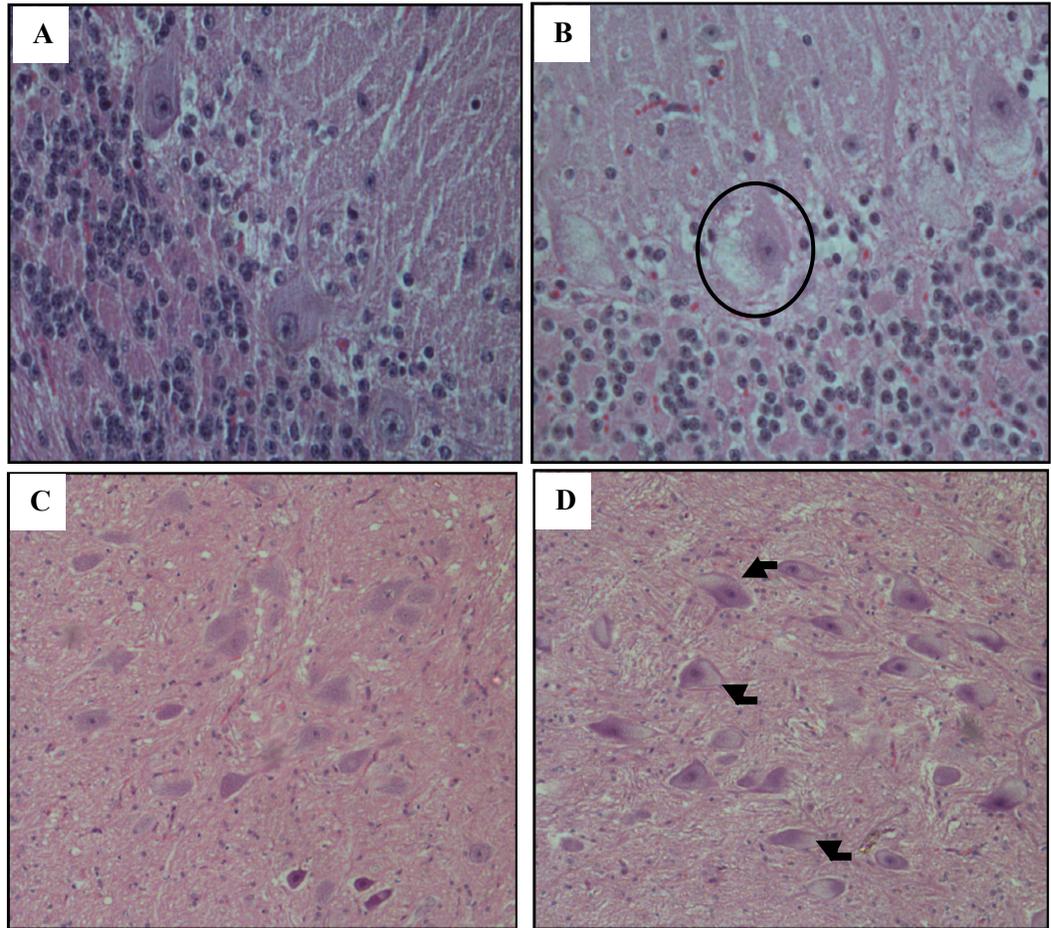
Particularmente, en cerebelo además de la vacuolización en células de Purkinje, células de Golgi y células granulares, se observó el árbol dendrítico y los axones de las células de Purkinje aumentados de 2 a 3 veces en espesor, generando un cambio en la arquitectura de la capa molecular (**Figura N° 3.4**). En periferia a las neuronas de los núcleos profundos y en vecindad del soma de las células de Purkinje se observaron estructuras circulares eosinofílicas de diversos tamaños, clasificadas como esferoides axonales y torpedos.

Figura N° 3.4 (A) Corteza cerebelar en un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese el cambio en la morfología de la capa molecular debido al aumento del espesor del árbol dendrítico (flechas)



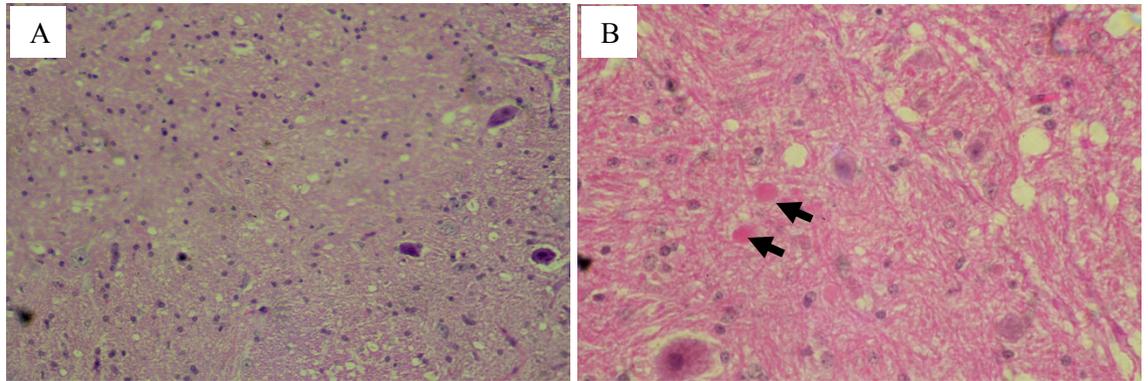
En las regiones del SNC de los ovinos tratados, se observaron diferentes grados de severidad de la vacuolización: i) en las células de Purkinje la cromatólisis fue total, con vacuolas coalescentes que tenían aspecto de “burbujas” generando una disrupción total del citoplasma con cambios evidentes en la arquitectura celular (**Figura N° 3.5B**), y ii) en neuronas del núcleo reticular medular, la cromatólisis fue fina y extensa observándose dilatación del cuerpo neuronal (**Figura N° 3.5D**).

Figura N° 3.5: (A) Células de Purkinje de un ovino del GC y (B) de un ovino del GT, la severa vacuolización ocupó todo el citoplasma desplazando el núcleo hacia la periferia (circulo). (C) Núcleo reticular medular de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la severa vacuolización fina que ocupó gran parte del citoplasma y desplaza el núcleo hacia la periferia (flechas).



En el núcleo *gracilis* se observaron estructuras circulares eosinofílicas de diversos tamaños, clasificados como esferoides axonales (**Figura N° 3.6**).

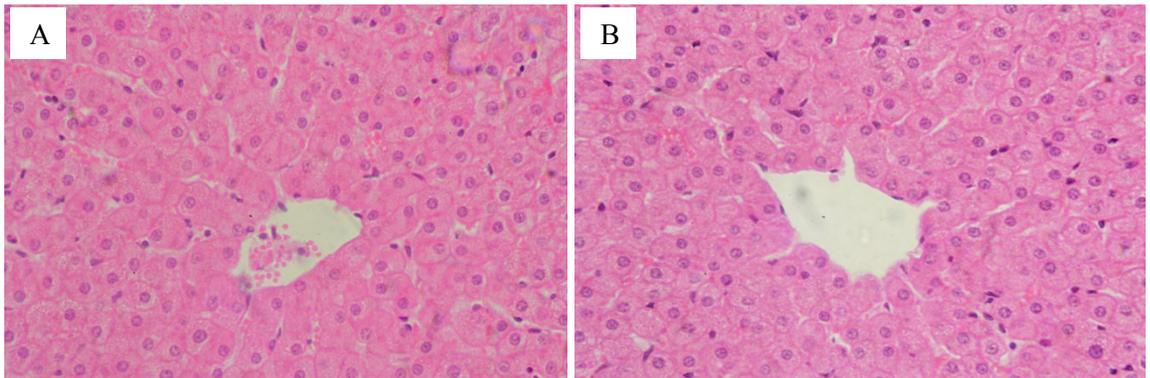
Figura N° 3.6 (A) Núcleo gracilis de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la presencia de numerosos esferoides axonales (flechas)



b) *Hígado*

En este órgano no se observaron diferencias evidentes entre animales tratados y los controles (**Figura N° 3.7**).

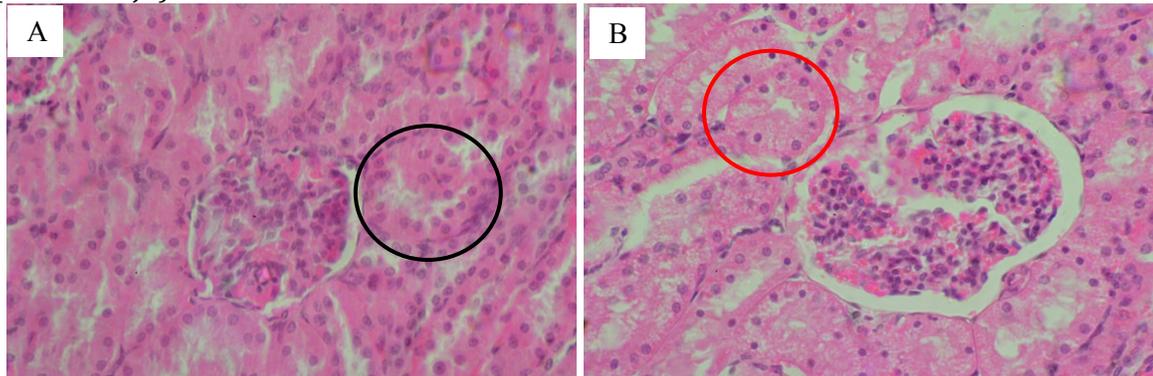
Figura N° 3.7 (A) Parénquima hepático de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la ausencia de alteraciones evidentes en los hepatocitos.



c) *Riñón*

En los ovinos del grupo tratado, la vacuolización a nivel renal se observó en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales de la corteza renal y los túbulos colectores principalmente de la región medular. El grado de la lesión fue severo generando una modificación en la arquitectura celular. Los ovinos del grupo control no presentaron alteraciones renales detectables en la histología (**Figura N° 3.8**).

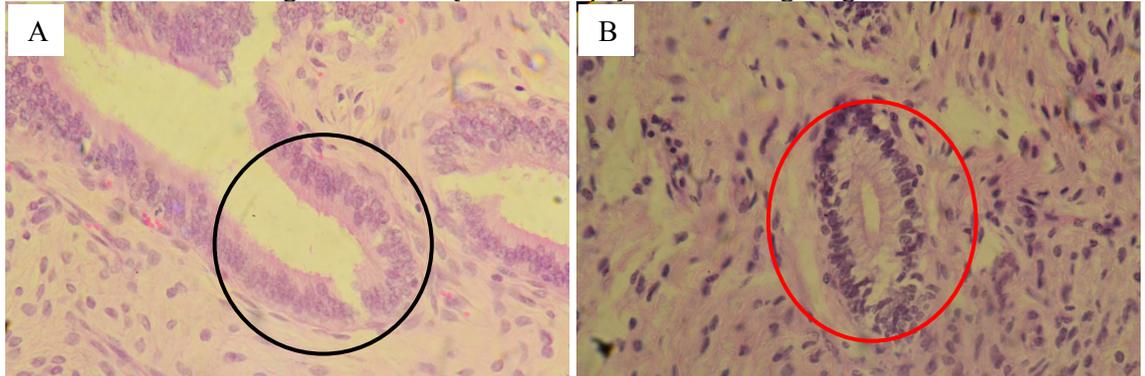
Figura N° 3.8 (A) Tejido renal de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Se observa moderada vacuolización en células epiteliales de los túbulos contorneados proximales (círculo rojo).



d) *Útero*

En los ovinos del grupo tratado, se observó vacuolización fina y generalizada en el epitelio endometrial y glandular. Los ovinos del grupo control no presentaron alteraciones uterinas detectables en la histología (**Figura N° 3.9**).

Figura N° 3.9 A) Glándulas uterinas de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. Nótese la vacuolización en células glandulares (círculo rojo). Círculo negro: glándula normal.

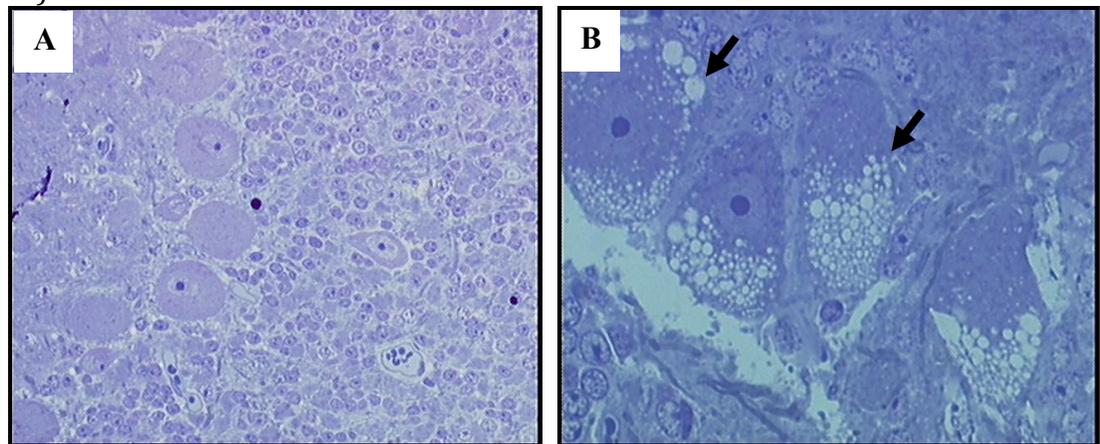


Hallazgos microscopia electrónica.

Cortes semifinos

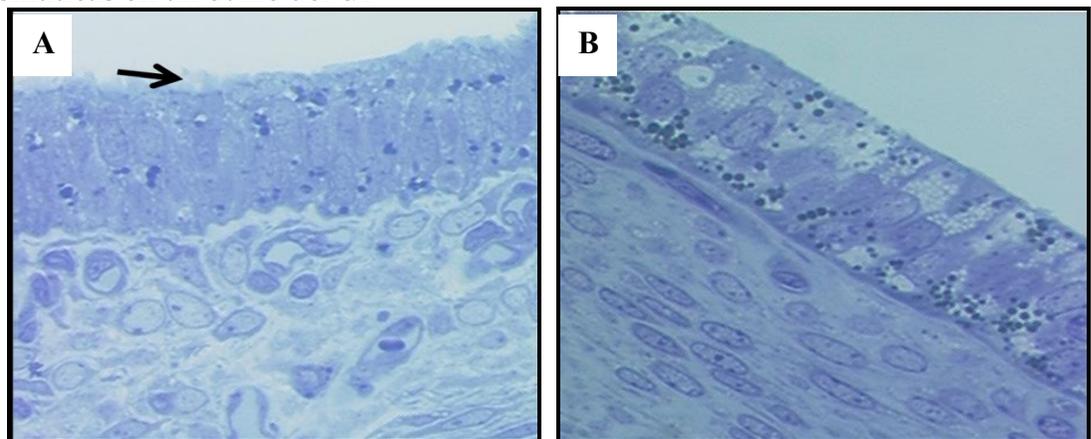
a-En cerebelo, se observaron con mayor detalle las vacuolas citoplasmáticas en las células de Purkinje de los ovinos del grupo tratado. En estas células se distinguieron numerosas vacuolas que ocupaban más de la mitad del espacio citoplasmático. En las muestras de los ovinos del grupo control, las células de Purkinje y las células estrelladas se observaron con el citoplasma homogéneo y sin vacuolización (**Figura N° 3.10**).

Figura N° 3.10 (A) Células de Purkinje y estrelladas con citoplasma homogéneo y normal de un ovino del GC. (B) Células de Purkinje con numerosas vacuolas citoplasmáticas (flechas) de un ovino del GT



b-En útero de los ovinos del grupo tratado se observó un patrón de vacuolización principalmente en epitelio uterino. Sobre el borde apical del epitelio se apreció la ausencia de secreción; sin embargo los gránulos de secreción se mantuvieron en cantidad y tamaño. En animales controles se observaron células cilíndricas con una secreción mucoide sobre el borde apical del epitelio (**Figura N° 3.11**).

Figura N° 3.11 (A) Epitelio uterino de células cilíndricas con citoplasma homogéneo y secreción mucoide (flecha) en un ovino del GC. (B) Epitelio uterino con numerosas vacuolas citoplasmáticas en un ovino del GT

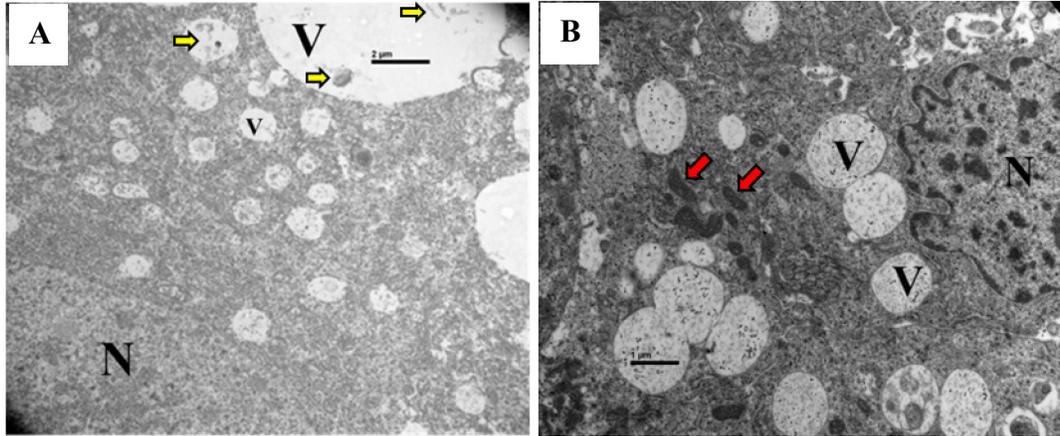


Cortes ultrafinos

a) Cerebelo

Ultraestructuralmente, en las células de Purkinje las vacuolas midieron entre 1-10 μ m constituidas por una membrana simple. La mayoría de las vacuolas contenían material granuloso electrodenso en su interior correspondiente a fragmentos de membrana, sustancias amorfas o gránulos densos. Este patrón se observó en las células de Purkinje, células de la granulosa y astrocitos (**Figura N° 3.12**).

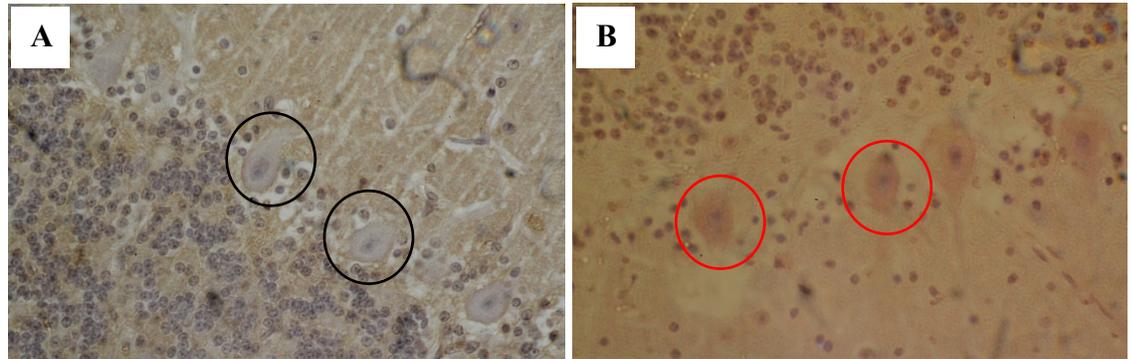
Figura N° 3.12 (A) Célula de Purkinje de un ovino del GT y (B) astrocito de un ovino del GT. Obsérvese la gran cantidad de vacuolas (V) citoplasmáticas de diversos tamaños y algunas con material granular en su interior (flechas amarillas). Tanto el núcleo (N) como las mitocondrias (flechas rojas) se observan con su estructura normal. MET.



Resultados de lectinohistoquímica.

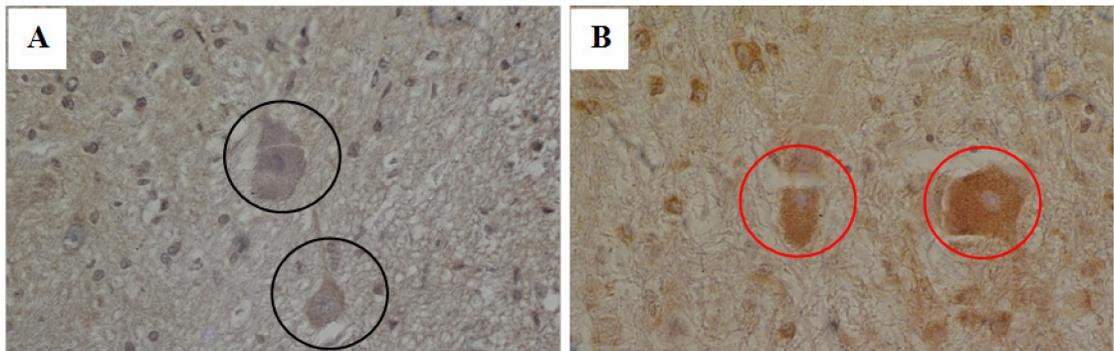
En las muestras de cerebelo de los ovinos del grupo tratado, se observó una leve marcación con LCA y sWGA en células de Purkinje y fuerte marcación en las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo (**Figura N° 3.13**). Con la lectina RCA la marcación fue negativa y con la Con-A reveló un aumento de la marcación del fondo, que no permitió apreciar diferencias entre los ovinos del grupo control y grupo tratado para ambas lectinas.

Figura N° 3.13 (A) Células de Purkinje de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión moderada para la lectina LCA (círculos rojos). En neuronas de un animal control no se observó marcación (círculos negros). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.



En las muestras de médula oblonga de los ovinos del grupo tratado, las neuronas extrapiramidales del núcleo reticular medular fueron fuertemente marcadas en su citoplasma con las lectinas afines a α -manosa y N-acetilglucosamina (LCA y sWGA) (**Figura N° 3.14**). Las neuronas del núcleo hipoglosos presentaron una marcación moderada con las mismas lectinas.

Figura N° 3.14 (A) Médula oblonga de un ovino del GC y (B) un ovino del GT. La marcación de color marrón pardo representa la unión fuerte para la lectina LCA en neuronas (círculos rojos). En neuronas de un animal control no se observó marcación (círculos negros). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris.



El grado de marcación con las lectinas utilizadas en diferentes grupos se detalla en la

Tabla N° 3.7.

Tabla N° 3.7 Promedio del grado de marcación de las lectinas. Se observan las diferencias en la marcación según área del SNC evaluadas para los dos grupos de ovinos.

Lectina	Neuronas evaluadas	GC	GT
LCA	Células de Purkinje	-	+
	Núcleo profundo del Cerebelo	-	+++
	Núcleo Hipogloso	-	++
	Núcleo Reticular Lateral	-	+++
sWGA	Células de Purkinje	-	-
	Núcleo profundo del Cerebelo	-	+++
	Núcleo Hipogloso	-	++
	Núcleo Reticular Lateral	-	++
RCA	Células de Purkinje	+	-
	Núcleo profundo del Cerebelo	-	-
	Núcleo Hipogloso	-	-
	Núcleo Reticular Lateral	-	-
Con-A	Células de Purkinje	++	++
	Núcleo profundo del Cerebelo	+	++
	Núcleo Hipogloso	++	++
	Núcleo Reticular Lateral	++	+++

Ref. (-) negativo; (+) suave; (++) moderado; (+++) fuerte

5.3 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró reproducir experimentalmente por primera vez la intoxicación por *Astragalus pehuenches* en ovinos con una dosis diaria de 2mgSW/kgPV durante un período de 54 días. El protocolo utilizado simularía en una condición de campo que cada animal consumiera aproximadamente 110 gramos de planta verde todos los días durante 54 días. Las lesiones encontradas coinciden con lo descrito por Robles y col (2000) en un caso natural y en reproducciones experimentales con otras plantas que contienen swainsonina reportadas Stegelmeier y col (1999) y por Driemeier y col (2000).

En este estudio no se observaron diferencias significativas entre los animales tratados y los controles en el peso vivo como tampoco en la condición corporal. Esto fue corroborado en la necropsia por el abundante depósito de grasa que se determinó en ambos grupos y coincide con lo reportado por Robles y col (2000) quienes observaron abundante reservas grasas en ovinos afectados en casos de intoxicación natural por *Astragalus pehuenches*. Sin embargo, numerosos trabajos realizados con otras especies de *Astragalus* y *Oxytropis* han demostrado que la intoxicación genera emaciación (James y col, 1970, Stegelmeier, 1999) y pérdida del estado y deterioro general en la apariencia del animal (Huxtable y col, 1982) pero sin explicar el motivo de esta alteración.

En el presente estudio no se evidenciaron modificaciones del comportamiento en ninguno de los grupos utilizando una dosis 2.0 mgSW/kg/día y por un período de 54 días. Sin embargo, Stegelmeier y col (1999) en un estudio con *Oxytropis sericea* en ovinos a dosis de 0.8 a 1.0 mgSW/kg/día a partir de los 20 días reporta que los animales presentaron depresión y temblores musculares. En el mismo estudio, Stegelmeier y col correlacionaban los signos clínicos con

lesiones severas a nivel del sistema nervioso central. Si bien en el presente estudio también se observó severa vacuolización a nivel SNC, las mismas no se lograron manifestar clínicamente.

Los análisis bioquímicos de enzimas séricas permitieron establecer patrones en las alteraciones de la actividad de la enzima AST, aportando datos para la caracterización de la intoxicación ya que confirman los resultados obtenidos en cobayos realizados en la presente tesis, y son similares a trabajos previamente descriptos por Stegelmeier y col, (1995; 2005).

El patrón de la actividad enzimática de α -manosidasa se caracterizó por una disminución abrupta de la actividad enzimática en plasma en el grupo tratado en la primera y segunda semana de ensayo, coincidiendo con lo observado en bovinos alimentados con *Astragalus lentiginosus* (Stelgemeier y col, 1994) y caprinos alimentados con *Sida carpinifolia* (Bedin y col, 2010). En los citados trabajos, la inhibición enzimática permaneció por debajo de los valores de referencia, en todo el período durante el cual los animales consumieron la planta; mientras que en el presente estudio, a partir de la tercera semana se observó en el grupo tratado un aumento de la actividad de la α -manosidasa hasta el punto de equipararse con los valores del grupo control al final del ensayo. Este fenómeno fue observado por Tulsiani y Touster (1983), citado por Daniel y col (1984), quienes determinaron un incremento inexplicable en el nivel tisular de la enzima en experimentos *in vivo* sobre animales tratados con swainsonina. Una hipótesis surgida del presente estudio es que existiría una “adaptación” y/o “retroalimentación” enzimática que se produce luego de un período entre 15 y 25 días de iniciado el consumo de swainsonina. La comprobación de este mecanismo es compleja y escapa a los objetivos de la presente tesis, por lo que se justificaría la realización de nuevos trabajos que permitan comprobar dicha hipótesis.

Del mismo modo que sucedió en la reproducción experimental en cobayos, en ovinos se pudo verificar la excreción temprana de oligosacáridos (OLG) en orina. Estos resultados

concuerdan con Bedin y col (2009) quienes en un trabajo en caprinos alimentados con *Sida carpinifolia* detectaron OLG a partir del cuarto día de consumo de la planta. En el presente estudio la excreción se mantuvo por todo el período de ensayo y determinó la excreción de más de un tipo de OLG. Daniel y col (1984) en un estudio químico más detallado establecieron que se excretaban cuatro oligosacáridos que varían únicamente en la cantidad de moléculas de manosa ($\text{Man}_{(2-5)}\text{GlcNAc}_2$). La determinación temprana de un metabolito específico de la intoxicación como serían los OLG, permitiría detectar a los animales subclínicos y poder así tener información para la toma de decisiones a nivel del pastoreo.

Microscópicamente, la vacuolización en sistema nervioso central, útero y riñón fue la lesión más significativa encontrada en los ovinos tratados. A nivel del sistema nervioso central esta lesión varió en intensidad y forma de presentación según el tipo de neuronas evaluadas. Las células de Purkinje fueron la principal población neuronal afectada tanto en intensidad de la lesión y forma de vacuolización. Tanto los resultados histopatológicos a nivel de sistema nervioso central como renal coinciden con las lesiones observadas en el caso natural ocurrido en el año 2000 (Robles y col, 2000), como en casos de ovinos intoxicados experimentalmente con *Astragalus lentiginosus* y *Oxytropis sericea* (Van-Kampen y col, 1971, Stegelmeier y col, 1999) y en otras α -manosidosis adquiridas (de Balogh y col, 1999; Driemeier y col, 2000). Ninguno de estos autores reportaron lesiones en útero, por lo que el presente sería el primer estudio en que se evaluó y describió dichas lesiones.

Si bien la vacuolización fue la principal y más generalizada lesión encontrada en cobayos y ovinos existieron diferencias en cuanto el cuadro histopatológico en el sistema nervioso central. Como se mencionó en el Capítulo II, las poblaciones neuronales afectadas con mayor severidad en los cobayos fueron las neuronas del núcleo hipogloso seguidas por las neuronas de los núcleos

profundos del cerebelo (**Tabla N° 2.4, pág.53**). En contraste, en los ovinos se determinó que la principal población neuronal afectada fueron las células de Purkinje seguidas por las neuronas de la corteza motriz (**Tabla N° 3.3**). Este patrón disímil entre especies animales ha sido reportado en otros trabajos (Stegelmeier y col, 1999; Cholich y col, 2013).

A nivel regional, la severa vacuolización en las células de Purkinje podría ser considerada de significancia diagnóstica. En la Patagonia argentina, la ausencia de enfermedades exóticas productoras de vacuolización en neuronas como scrapie y encefalopatía espongiforme bovina (EEB) (Schudel y col, 1997), y la ausencia de otros géneros de plantas que produzcan enfermedad de almacenamiento lisosomal como *Ipomoea spp*, *Sida spp*, *Oxytropis spp*; nos permiten proponer a esta lesión como lesión patognomónica en la región, para la intoxicación por plantas del género *Astragalus spp*.

Las lesiones encontradas en el útero son consideradas un hallazgo novedoso. Si bien el aspecto reproductivo de la intoxicación por plantas que contienen swainsonina ha sido estudiado por sus efectos estrogénicos (James y col, 1972), abortigénicos (van Kampen y col, 1971) y teratogénicos en ovinos (James, 1975), y a nivel vascular uterino y placentario en caprinos (Hafez y col, 2007; Armien y col, 2011), el útero no había sido producto de estudio con anterioridad al presente trabajo. La vacuolización observada en epitelio uterino y células epiteliales de la glándula endometrial podrían explicar las pérdidas gestacionales que son imputadas a la intoxicación por plantas con swainsonina en animales de producción (James y col, 1972).

El patrón de marcación de las lectinas LCA y sWGA, coincide con reportes anteriores, confirmando que existe material glicosilado acumulado en el citoplasma celular y que este material está principalmente constituido por compuestos ricos en manosa y N-acetilglucosamina.

De esta forma se corrobora la utilidad de la lectinohistoquímica para la confirmación de α -manosidosis adquirida (Alroy y col, 1985; Driemeier y col, 2000).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que *Astragalus pehuenches* produce una enfermedad de almacenamiento lisosomal similar a la que se produce por el consumo de otras especies de plantas que contienen swainsonina. El éxito en la reproducción experimental de la intoxicación tanto en cobayos como en ovinos, permitirá profundizar los estudios de la enfermedad con el fin de determinar métodos de diagnóstico precoz, tratamientos y/o prevención de la intoxicación en ovinos.

6 CONCLUSIONES FINALES

1. El presente trabajo constituye el primer estudio del país en el que determinó que las poblaciones de *Astragalus pehuenches* de la región sur de la provincia de Río Negro son tóxicas, detectándose valores de 70 y 100 veces más de swainsonina que el umbral tóxico.
2. Se logró reproducir por primera vez la intoxicación por *Astragalus pehuenches* en cobayos mediante la administración de planta entera a una dosis diaria de $\approx 15\text{mgSW/kg}$ durante 54 días. Se propone que el uso del cobayo sea utilizado meramente si se desea tener la confirmación por afirmativo o negativo sobre la acción toxigénica de una especie vegetal sospechada de poseer swainsonina.
3. Se logró reproducir por primera vez la intoxicación por *Astragalus pehuenches* en ovinos mediante la administración de planta entera a una dosis diaria de 2mgSW/kg durante 54 días. Los hallazgos histopatológicos concuerdan con las lesiones reportadas en los casos naturales de la intoxicación por *Astragalus pehuenches* y con lesiones resultantes en intoxicaciones experimentales y naturales con otras especies y géneros de plantas que poseen swainsonina.
4. A partir de la primer semana de intoxicación se detectó la excreción de oligosacáridos en orina que caracteriza a la α -manosidosis, determinando que es una prueba específica para discernir entre animales que consumieron o no *Astragalus pehuenches*. Se propone

desarrollar un sistema de detección rápido y sencillo que pueda realizarse al pie del animal para ser utilizado en el diagnóstico subclínico temprano *in-vivo*, especialmente luego de la introducción de animales en campos con presencia de *Astragalus pehuenches*.

5. La vacuolización fue la principal lesión histopatológica encontrada en sistema nervioso central, tanto en cerebelo como en médula oblonga, siendo las células de Purkinje las neuronas más afectadas en ovinos. Basado en este hallazgo se propone que durante la necropsia se tome una muestra de cerebelo en formol, ya que la observación de vacuolización en células de Purkinje podría ser considerada una lesión patognomónica para esta intoxicación en la región patagónica.
6. Por primera vez se reportan lesiones de vacuolización en epitelio y glándulas endometriales del útero en animales que consumieron *Astragalus pehuenches*. Lo que plantea la hipótesis de que estas lesiones podrían generar alteraciones estructurales que distorsionarían la funcionalidad celular, pudiéndose explicar algunos de los trastornos reproductivos que generan las plantas que contienen swainsonina.
7. Las técnicas de lectinohistoquímica e inmunohistoquímica permitieron caracterizar a la intoxicación por *Astragalus pehuenches* como una enfermedad neurodegenerativa por almacenamiento lisosomal de compuestos glicosados ricos en manosa y N-acetilglucosamina.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, D.J.; Sidebothom, R.; Winchester, B.G.; Dorling, P.R.; Dell, A. (1983). Swainsonine affects the processing of glycoproteins in vivo. Federation of European Biochemical Societies. 163:110-113.
2. Alroy, J.; Orgad, U.; Ucci, A.A.; Gavis, V.E. (1985). Swainsonine toxicosis mimics lectin histochemistry of mannosidosis. Veterinary Pathology. 22: 311-316.
3. Armién A.G.; Tokarnia C.H.; Vargas Peixoto P.; Barbosa J.D.; Frese K. (2011). Clinical and morphologic changes in ewes and fetuses poisoned by *Ipomoea carnea* subspecies *fistulosa*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 23:221-232.
4. Auclair, D. & Hopwood, J.J. (2007). Morphopathological features in tissues of alpha-mannosidosis guinea pigs at different gestational ages. Neuropathology and Applied Neurobiology. 33: 572-585.
5. Bedin, M.; Colodel, E.M.; Giugliani, R.; Zlotwski, P.; Cruz, C.E.F.; Driemeier, D. (2009). Urinary oligosaccharides: A peripheral marker for *Sida carpinifolia* exposure or poisoning. Toxicon. 53:591-594.
6. Bedin, M.; Colodel, E.M.; Viapiana, M.; Matte, U.; Driemeier, D.; Giugliani, R. (2010). Alpha-mannosidase activity in goats fed with *Sida carpinifolia*. Experimental and Toxicologic Pathology 62: 191-195.
7. Blakemore, W.F. (1986). A case of mannosidosis in a cat: clinical and histopathological findings. J Small Anim Pract. 27:447-455.
8. Bolivar, V.J.; Manley, K.; Messer, A. (2004). Early exploratory behavior abnormalities in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. Brain Research 1005: 29-35.

9. Bran D, Ayesa J, López C. 2000. Regiones ecológicas de Río Negro. INTA EEA Bariloche Comunicación Técnica de Relevamiento Integrado 59, p: 8.
10. Braun, K; Romero, J.; Liddell, C.; Creamer R. (2003). Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. *Mycol. Res.* 107: 980–988.
11. Chenchen, W; Wenlong, W; Xiaoxue L; Feng, M; Dandan, C; Xiaowen, Y; Shanshan; W; Pengshuai, G; Hao, L; Baoyu, Z. (2014). Pathogenesis and preventive treatment for animal disease due to locoweed poisoning. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 37: 336-347.
12. Cholich L.A.; Gimeno E.J.; Teibler P.G.; Jorge N.L.; Acosta de Pérez O.C. (2009). The guinea pig as an animal model for *Ipomoea carnea* induced α -mannosidosis. *Toxicon.* 54: 276-282. Cholich, L.A. (2011). Caracterización toxicológica de una enfermedad de almacenamiento lisosomal en cobayos inducida por *Ipomoea carnea* en Argentina. Tesis Doctoral. UNNE. 168 pág.
13. Cholich, L.A.; Márquez, M.; Pumarola i Batlle, M.; Gimeno, E.J.; Teibler, G.P.; Rios, E.E.; Acosta, O.C. (2013). Experimental intoxication of guinea pigs with *Ipomoea carnea*: Behavioural and neuropathological alterations. *Toxicon.* 76: 28–36.
14. Colegate, S. M., Dorling, P. R. & Huxtable, C. R. (1979). A spectroscopic investigation of swainsonine an α -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. *Australian Journal Chemistry.* 32: 2257-2264.
15. Cook D., Gardner D.R., Grum D., Pfister J.A., Ralphs M.H., Welch K.D., Green B.T. (2011). Swainsonine and endophyte relationships in *Astragalus mollissimus* and *Astragalus lentiginosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59:1281-1287.
16. Cook, D.; Beaulieu, W.T.; Mott, I.; Riet-Correa, F.; Gardner, D.R.; Grum, D.S.; Pfister, J.A.; Clay, K.; Marcolongo-Pereira, C. (2013). Production of the alkaloid swainsonine by a

fungal endosymbiont of the Ascomycete Order Chaetothyriales in the host *Ipomoea carnea*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. DOI: 10.1021/jf4008423.

17. CPVCS -Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur- (2014). Sitio web: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>. Consultado en diciembre 2014.

18. Crawley, A.C.; Jones, M.Z.; Bonning, L.E.; Finnie, J.W.; Hopwood, J.J. (1999). α -Mannosidosis in the guinea-pig: a new animal model for lysosomal storage disorders, *Pediatr. Res.* 46: 501–509.

19. Damme, M.; Stroobants, S.; Walkley, S. (2012). Cerebellar alterations and gait defects as therapeutic outcome measures for enzyme replacement therapy in α -mannosidosis. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology.* 70:83–94.

20. Daniel, P., Warren, C.D.; James, L.F.(1984). Swainsonine-induced oligosaccharide excretion in sheep. Time-dependent changes in the oligosaccharide profile. *Biochem. J.* 221: 601-607.

21. Dantas, A.F.M; Riet-Correa, F.; Gardner D.R.; Medeiros R.M.T.; Barros S.S.; Anjos B.L.; Lucena R.B. (2007). Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. *Toxicon.* 49: 111-116.

22. de Balogh, K.K.I.M.; Dimande, A.P.; van der Lugt, J.J.; Molyneux, R.J.; Naude', T.W.; Welman, W.G.(1999). A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 11:266–273.

23. Dorling, P.R.; Huxtable, C.R., Colegate, S.M. (1980). Inhibition of lysosomal α -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem J.* 191: 649-651.

24. D'Ottavio, G.E.; Parodi, R.; Montero, J.E.; Egri, N.; Carlson, D.; Greca, A. (2008). Creatinfosfoquinasa y su aplicación clínica. Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio. N° XVI.
25. Driemeier D., Colodel E. M., Gimeno E. J., Barros S. S. (2000). Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Veterinary Pathology*. 37: 153-159.
26. Fix, A.S & Garman, R.H. (2000). Practical Aspects of Neuropathology: A Technical Guide for Working with the Nervous System. *Toxicol Pathol*. 28: 122-131.
27. Furlan, F.H.; Luciola, J.; Veronezi, L.O.; Medeiros, A.L.; Barros, S.S.; Traverso, S.D.; Gava, A. (2009). Spontaneous Lysosomal Storage Disease Caused by *Sida carpinifolia* (Malvaceae) Poisoning in Cattle. *Vet Pathol*. 46:343–347.
28. Galey, F.D. (2010). Plantas y otros tóxicos naturales. En: Medicina interna de grandes animales. Smith, B.P. Cuarta edición. Ed. Elsevier Mosby.
29. Gardner D.R., Molyneux R.J., Ralphs M.H. (2001). Analysis of swainsonine: extraction methods, detection, and measurement in populations of locoweeds (*Oxytropis spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4573-4580.
30. Gómez-Sosa, E. (1979). Las especies sudamericanas del género *Astragalus* (Leguminosae). Las especies patagónicas argentinas. *Darwiniana*, 22: 313-376.
31. Gómez-Sosa, E. (1984). *Astragalus* L. In: M. Correa, Flora Patagónica, Parte IV b (Droseráceas a Leguminosae). Colección Científica del INTA, Buenos Aires. p. 175-206.
32. Gómez-Sosa, E. (2010). Nueva especie del género *Astragalus* (Leguminosae, Galegeae) para Perú. *Darwiniana*. 48:1-6.
33. Grum, D.S.; Cook, D.; Baucom, D.; Mott, I.W.; Gardner, D.R.; Creamer, R.; Allen, J.G.. (2013). Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endophyte in the host *Swainsona canescens*. *J. Nat. Prod*. 76:1984–1988.

34. Hafez, S.A; Caceci, T; Freeman, LE; Panter, KE. (2007). Angiogenesis in the caprine caruncles in non-pregnant and pregnant normal and swainsonina-treated does. *The Anatomical Record*. 290:761-769.
35. Haraguchi M, Gorniak SL, Ikeda K, Minami H, Kato A, Watson AA, Nash R, Molyneux RJ, Asano N. (2003). Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *J Agric Food Chem*. 51:4995–5000.
36. Harries, W.N.; Baker, F.P.; Johnston, A. (1972). An outbreak of locoweed poisoning in horses in Southwestern Alberta. *Can. Vet. Jour.* 13:141-145.
37. Hemsley, K.M.; Hopwood, J.J. (2005). Development of motor deficits in a murine model of mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-III A). *Behav. Brain Res.* 158:191–199.
38. Hueza, I.M.; Guerra, J.L.; Haraguchib, M.; Asanoc, N.; Górnaiak, S.L. (2005). The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: A study in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57: 53–58.
39. Huxtable C.R. and Dorling, P.R. (1982). Swainsonine-Induced Mannosidosis. *American Association of Pathologists*. 117: 124-126.
40. Huxtable, C.R. (1969). Experimental reproduction and histo-pathology of *Swainsona galegifolia* poisoning in the guinea-pig. *Aust J. Exp. Biol. Med. Sci.* 47: 339-347.
41. James L., van Kampen E., Hartley W.L. (1970). Comparative pathology of *Astragalus* (Locoweed) and *Swainsona* poisoning in sheep. *Veterinary Pathology*. 7: 116-125.
42. James, L. & Foote, W. (1972). Estrogenic Properties of Locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Can. J. Comp. Med.* 36: 360-365.
43. James, L. (1975). Effect of Locoweed (*Astragalus lentiginosus*) Feeding on Fetal Lamb Development. *Can. J. Comp. Med.* 40: 380-384.

44. Jefferies, B. C. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal Agriculture*. 32: 19-21.
45. Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain*. 126:974–987.
46. Jolly, R.D. & Walkley, S.U. (1997). Lysosomal Storage Diseases of Animals: An Essay in Comparative Pathology. *Vet Pathol*. 34: 527.
47. Jolly, R.D. (1971). The pathology of the central nervous system in pseudolipidosis of Angus calves. *J Pathol*. 103: 113-121.
48. Jolly, R.D. (1978). Mannosidosis and its control in Angus and Murray Grey cattle. *NZ Vet J*. 26: 194-198.
49. Jubb, K & Kennedy J. (2007). Pathology of domestic animals. Ed. Elsevier. Cuarta edición.
50. Kauffer, C & Heinken, R. (1984). Informe sobre mortandad de equinos en el Dpto Gastre por intoxicacion con *Astragalus* spp. Direccion de Ganaderia de la provincia de Chubut. Secretaria de Asuntos Agrarios. Argentina. (Inédito).
51. Law, S.L. & Anson, R.B. (1968). Neuronopathy in sheep fed *Swainsona luteola* and *Swainsona galegijolia*. *Aust. Vet. J*. 44: 447.
52. Li Q., Hao C., Xu Y., Liang J., Yang K., Cui Z. (2012). Identification of a new locoweed (*Oxytropis serioopetala*) and its clinical and pathological features in poisoned rabbits. *The Journal of Veterinary Medical Science*. Advance publication.
53. Loretto A.P; Colodel E.M.; Gimeno E.J.; Driemeier D. (2003). Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. *Equine Veterinary Journal*. 35: 434-438.

54. Marsh, D.C. (1909). The locoweed disease of the plains. US Department of Agriculture. Bureau of animal industry Bolletín 112. p.: 116.
55. Meikle, P.J.; Hopwood, J.J.; Clague, A.E. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA. 281: 249–254.
56. Melgoza Castillo, A; Royo Marquez, M.H.; Morales Nieto, C.R.; Sierra Tristán, J.S. (2003). Germinación de semillas de hierba loca (*Astragalus mollissimus* Torr) con diferentes niveles de humedad y temperatura. Tér Pecu Méx. 41:85-89.
57. Micheloud, JF; Marin, R; Colque Caro, L; Imas, N; Martinez, O; Gardner, DR; Gimeno, EJ. (2015). Alfa-manosidosis en un hato de cabras por consumo de *Sida variegata* (Griseb.) Krapov. 9° Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina. Resumen.
58. Molyneux R.J y Gómez-Sosa E. (1991). Presencia del alcaloide indolizidínico Swainsonine en *Astragalus pehuenches* (Leguminosae galegaeae). Boletín Sociedad Argentina Botánica. 27: 59-64.
59. Molyneux R.J., James L.F., Ralphs M.H., Pfister J.A., Panter K.P., Nash R.J. (1994). Polyhydroxy alkaloids glycosidase inhibitors from poisonous plants of global distribution: analysis and identification, p.107-112. In: Colegate S.M. & Dorling P.R. (ed.), Plant Associated Toxins: agricultural, phytochemical and ecological aspects. CAB International, Wallingford, UK.
60. Molyneux, R.J., McKenzie, R.A., O’Sullivan, B.M., Elbein, A.D. (1995). Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in weir vine (*Ipomoea sp. Q6 aff. Calobra*) and correlation with toxicity. J. Nat. Prod. 6: 878–886.
61. Nishida, F. (2014). Estudio morfofpatológico de poblaciones celulares de la médula espinal de ratas inoculadas con diferentes neurotoxinas. Tesis Doctoral UNLP. p: 232.

62. Paxinos, G. & Watson C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates, Sixth ed. Elsevier, Burlington, USA. p: 451.
63. Pearse DD, Lo TP Jr, Cho KS, Lynch MP, Garg MS, Marcillo AE, Sanchez AR, Cruz Y, Dietrich WD (2005). Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*. 22: 680-702.
64. Pedroso, P.O.; von Hohendorf, R.; Oliveira, G.; Schmitz, M.; Cruz, C.; Driemeier, D. (2009). *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in fallow deer (*Dama dama*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 40:583-585.
65. Peters, M. (2002). A laboratory manual for the dissection of the sheep brain. Ed. The University of Guelph. Canada.
66. Petzold A., Eikelenboom M.J., Gveric D., Keir G., Chapman M., Lazeron R. H. C., Cuzner M. L., Polman C. H., Uitdehaag B. M. J., Thompson E. J., Giovannoni G. (2002) Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 125:1462-1473
67. Pienaar, JG; Kellerman, TS; Basson, PA; Jenkins, WL; Vahrmeijer, J (1976). Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum kwebense* N. E. Br. Onderstepoort J Vet Res. 43: 67-74.
68. Pritchard, D.H., Huxtable, C.R., Dorling, P.R., 1990. Swainsonine toxicosis suppresses appetite and retards growth in weanling rats. *Res. Vet. Sci*. 48: 228–230.
69. Pryor, B.M.; Creamer, R.; Showmaker, R. A.; McClain-Romero, J.; Hambleton, S. (2009). *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. *Botany*. 87: 178–194.

70. Ragonese, AE. (1975). Plantas tóxicas para el ganado de la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Tomo XXIX. N°3.
71. Ralphs MH, Panter KE, James LF. (1990). Feed preferences and habituation of sheep poisoned by locoweed. *J Anim Sci.* 68:1354-1362.
72. Rhoades, D.F. (1979). Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: G.A. Rosenthal and D.H. Janzen (Ed.) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites* pp: 3-54. Academic Press, New York.
73. Robinson A.J.; Crawley A.C.; Auclair D.; Weston P.F.; Hirte C.; Hemsley K.M.; Hopwood J.J. (2008). Behavioural characterisation of the α -mannosidosis guinea pig. *Behavioural Brain Research* 186: 176–184.
74. Robles C.A., Saber C., Jeffrey M. (2000). Intoxicación por *Astragalus pehuenches* (locoismo) en ovinos Merino de la Patagonia Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria.* 81: 380-384.
75. Russell, W.M.S. & Burch, R.L., (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, London. ISBN 0900767782.
76. Sager R, 1985. Estudio químico-toxicológico de *Astragalus distinens* Macloskie y *Astragalus bergii* Hieronimus. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 130 pág. URL:<http://hdl.handle.net/10915/1526>
77. Salisbury, F. & Ross, C. *Fisiología de las plantas 1: Células, agua, soluciones y superficies.* Thomsom Editores Spain. Paraninfo S.A. ISBN 1-59331-293-8.
78. Scherson, R. A.; Vidal, R.; Sanderson M. J. (2008). Phylogeny, biogeography, and rates of diversification of new world *Astragalus* (leguminosae) with an emphasis on South American radiations. *American Journal of Botany.* 95: 1030–1039.

79. Schudel, A.A.; Alvarez, C; Clos, P; Kistermann, JC; Blanco Viera, J; Carillo, BJ; Weber, EL. (1997). Scrapie, risk factors in Argentina. Informe técnico de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación Argentina. ISBN: 987-96849-1-5.
80. Sedy, J.; Urdzikova L.; Jendelova, P.; Sykova, E. (2008). Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32: 550–580.
81. Stegelmeier B.L., James L. F., Panter K. E., Gardner D. R, Pfister J. A., Ralphs M. H., Molyneux R. J. (1999). Dose response of sheep poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 448-456.
82. Stegelmeier B.L., James L.F., Gardner D.R., Panter K.E., Lee S.T., Ralphs M.H., Pfister J.A., Spraker T.R. (2005). Locoweed (*Oxytropis sericea*) induced lesions in mule deer (*Odocoileus hemionus*). *Veterinary Pathology*. 42: 566-578.
83. Stegelmeier BL, Ralphs MH, Gardner DR, Molyneux FU, James LF. (1994). Serum a-mannosidase and the clinicopathologic alterations of locoweed (*Astragalus mollissimus*) intoxication in range cattle. *J Vet Diagn Invest* 6:473-479.
84. Stegelmeier, B.L.; Molyneux, R.J.; Asano, N.; Watson, A.A.; Nash, R.J. (2008). The Comparative Pathology of the Glycosidase Inhibitors Swainsonine, Castanospermine, and Calystegines A3, B2, and C1 in Mice. *Toxicol Pathol*. 36: 651-659.
85. Stegelmeier, B.L.; Molyneux, R.J.; Elbein, A.D.; James, L.F. (1995). The Lesions of Locoweed (*Astragalus mollissimus*), Swainsonine, and Castanospermine in Rats. *Vet Pathol*. 32:289-298.
86. Summer, B.A., Cummings J.F., de Lahunta A. (1995). *Veterinary Neuropathology*, First ed. Mosby-Year Book, St. Louis. USA. pp-527.

87. Takeda, S., Tanaka, H., Shimada, A., Morita, T., Ishihara, A., Adilbish, A.; Delgermaa, B.; Gungaa, O. (2014). Cerebellar Ataxia Suspected to Be Caused by *Oxytropis glabra* Poisoning in Western Mongolian Goats. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 839-846.
88. Tokarnia, C.H. (2012). *Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção*. Ed. Helianthus. ISBN 978-85-87809-03-2.
89. Tulsiani, D. R. P.; Harris, T.M.; Touster, O. (1982) Swainsonine Inhibits the Biosynthesis of Complex Glycoproteins by Inhibition of Golgi Mannosidase II. *The Journal of Biological Chemistry.* 257: 7936-7939.
90. Tulsiani, D.R.P. & Touster, O. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 594-600
91. Van-Kampen K.R. & James L.F. (1969). Pathology of locoweed poisoning in sheep. *Pathol Vet.* 6: 413-423.
92. Van-Kampen K.R. & James L.F. (1971). Ovarian and Placental Lesions in Sheep from Ingesting Locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Vet. Path.* 8: 193-199.
93. Villagra, S., Easdale, M., Bolla, D., 2008. Efectos de la sequía sobre la situación de la ganadería extensiva de la provincia de Rio Negro. Series: Comunicaciones Técnicas ISSN 1667-4014. N° 223. 20p.
94. Villalba J.J.; Manteca X.; Provenza, F.D. (2009). Relationship between reluctance to eat novel foods and open-field behavior in sheep. *Physiology & Behavior.* 96:276–281.
95. Walkley SU, Baker HJ, Rattazzi MC, Haskins ME, Wu JY. (1991). Neuroaxonal dystrophy in neuronal storage disorders: evidence for major GABAergic neuron involvement. *J Neurol Sci* 104: 1-8.

96. Warren, C.D.; Daniel, P.F.; Bugge, B.; Evans, J.E.; James, L.F.; Jeanloz, R.W. (1988). The Structures of Oligosaccharides Excreted by Sheep with Swainsonine Toxicosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 263: 1504-15049.
97. Williams, M.C. & Gomez-Sosa E. (1986). Toxic Nitro Compounds in Species of *Astragalus* (Fabaceae) in Argentina. *Journal of Range Management* 39:341-344.
98. Williams, M.C. (1981). Nitro compounds in foreign species of *Astragalus*. *Weed Science*. 29:261-269.
99. Winchester, B. (2005). Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology*. 15: 1–15.
100. Yu Y., Zhao Q., Wang J., Wang J., Wang Y., Song Y., Geng G., Li Q. (2010). Swainsonine-producing fungal endophytes from major locoweed species in China. *Toxicon*. 56: 330-338.