



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN DE MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS
HEPÁTICAS DE RATAS WISTAR, ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y GENOTOXICIDAD
DE *Cestrum parqui* L'HER ("DURAZNILLO NEGRO", SOLANACEAE) Y *Pascalia
glauca* ORTEGA ("SUNCHILLO", ASTERACEAE).**

Autor: Méd. Vet. Javier Leandro Barberón

Director: Dr. Pedro Zeinsteger

Codirector: Dr. Alejandro Palacios

Cátedra de Bioquímica

Nómina de miembros de jurado propuesto:

Dr. Ernesto Odriozola (INTA Balcarce) (Titular)

Dr. Rafael Ricco (FFyB, UBA) (Titular)

Dr. Sebastián Picco (FCV, UNLP) (Titular)

DEDICATORIA

A mi familia, mis amigos y mascotas.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que me permitió el poder realizar mi carrera universitaria, por el apoyo incondicional que siempre me brindaron cuando uno como estudiante decide tomar caminos distintos a otra ciudad.

A mi director, Dr. Pedro Zeinsteger y codirector Dr. Alejandro Palacios, que me convocaron a formar parte del Laboratorio de Bioquímica, que me han enseñado desde cuestiones académicas y de crecimiento personal, donde he podido aprender, planificar, diseñar con ellos de manera continua, desde la investigación y la docencia, así como también realizar este trabajo de tesis, desempeñarme como docente, conocerlos a ellos y a otras personas maravillosas.

A los jurados por todas las sugerencias realizadas oportunamente para enriquecer este trabajo de tesis.

A las Doctoras Gisel Padula y Analía Seone por su valiosa intervención en los ensayos de genotoxicidad y análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Al Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada, por todos los consejos brindados e iniciarme en esta hermosa labor que es la docencia universitaria.

A mis amigos, otro de los pilares fundamentales en mi vida. Aquellos que conocí en la Facultad, otros con los que tengo el privilegio de poder trabajar que nos hacen tan ameno la docencia e investigación. A Alejandro Palacios y Pedro Zeinsteger por su amistad, todos los consejos, sugerencias y charlas que siempre permitieron generar un aprendizaje significativo de las distintas tareas que se realizan en el Laboratorio de Bioquímica. A mis amigos de la vida que siempre han estado en aquellos momentos cruciales de los trayectos que he hecho.

A mis mascotas, que he tenido siempre desde chico, que tengo en la actualidad, los tránsitos que han pasado y por las que vendrán. Porque ellos nos hacen mejores personas y debemos recordar que adoptar a una mascota no va a cambiar el mundo en su totalidad, pero dicha acción va a cambiar la vida de ellos y la nuestra.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES E INTERNACIONALES CON REFERATO

- Costa EF, Streitenberger N, Barberón J, Zeinsteger P, Fazzio LE. Intoxicación por *Cestrum parqui* (“duraznillo negro”) en bovinos. Confirmación por análisis micrográfico del contenido ruminal. *Revista Veterinaria* 2014; 25 (1): 45-49. Con referato. ISSN (papel) 1668-4834, ISSN (on line) 1669-6840.
- Barberón JL, Ventura MB, Leaden PJ, Zeinsteger PA, Palacios A. Analysis of the effect of an extract of *Cestrum parqui* L’Herit (Solanaceae) on the peroxidation of rat liver microsomes *Chem. Research J* 2020; 5 (2): 1-7; con referato. ISSN 2455-8990.

RESÚMENES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Congresos nacionales

- Barberón J, Palacios A, Piergiagomi V, Leaden P, Zeinsteger P. Micrografía de la planta tóxica *Cestrum parqui* L’Her. (“duraznillo negro”) sometida a digestión ruminal *in vitro*. XIV Congreso de la Sociedad de Ciencias Morfológicas y 11^{vas} Jornadas de Educación, La Plata, 17 al 19 de septiembre de 2012. Libro de resúmenes 2012 SCMLP. Pág.80. Con referato. ISBN 978-987-26182-1-6.
- Barberón J. *Cestrum parqui* L’Her. (Solanaceae) “duraznillo negro” y *Wedelia glauca* Ort. Hoff. ex. Hicken (Asteraceae) “sunchillo”, dos plantas hepatotóxicas agudas para animales de producción. XVII Congreso Argentino de Toxicología. *Acta Toxicol Argent.* 21: 14-15. 2013. Con referato. ISSN 0327-9286.
- Barberón J, Zeinsteger P, Costa E, Fazzio L, Santelices A, Wright C, Gimeno E. Estudio microscópico de las lesiones provocadas por la planta tóxica *Cestrum parqui* L’Her. (“duraznillo negro”, Solanaceae) en hígado bovino. XVI Congreso de la Sociedad de Ciencias Morfológicas y 13^{ra} Jornadas de Educación. La Plata, 18 y 19 de septiembre de 2014. Libro de resúmenes 2014. SCMLP. Pág 63. Con referato. ISBN 978-987-26182-3-0.

- Barberón J, Piergiacomini V, Leaden P, Palacios A, Zeinsteger P. Efectos de estrés oxidativo inducidos por extractos de las plantas hepatotóxicas *Cestrum parqui* L'Her. ("duraznillo negro", Solanaceae) y *Wedelia glauca* Hoff. ex. Hicken ("sunchillo", Asteraceae) sobre mitocondrias y microsomas de hepatocitos de ratas Wistar. 2014. *Analecta Vet* 34 (1-2). Pág. 7. Con referato. ISSN Impresa: 0365514-8, Electrónica: 1514-2590.
- Barberón J, Becerra V, Palacios A, Leaden P, Zeinsteger P. Estudio micrográfico de la planta tóxica *Pascalina glauca* (Ort.) Hoff. ex. Hicken ("sunchillo") sometida a digestión ruminal *in vitro*. *Revista Ciencias Morfológicas*. 17 (Vol. 2). XVII Congreso de la Sociedad de Ciencias Morfológicas y 14^{avas} Jornadas de Educación. Pág. 74. Con referato. ISSN: 1851-7852.
- Barberón J, Leaden P, Palacios A, Zeinsteger P. Efecto del *Cestrum parqui* L'Herit (Solanaceae, "duraznillo negro") sobre la oxidación *in vitro* de microsomas hepáticos. *IN VET*. 2016; 18 (1). Pág. 71. Con referato. ISSN Impresa: 1514-6634, Electrónica: 1668-3498.
- Barberón J, Ventura B, Savignone C, Palacios A, Zeinsteger P. Phytochemical characterization of a methanolic extract of *Cestrum parqui* L'Herit and its effect of the peroxidation of rat liver microsomes. Is it pro-oxidative or antioxidative? *BIOCELL*. 40 (suppl. 2). XVIII Annual Meeting of the Argentine Biology Society. Pág. 15. Con referato. ISSN Electrónica: 1667-5746.

- Barberón J, Becerra V, Leggieri M, Palacios A, Zeinsteger P. Efectos de los extractos de *Cestrum parqui* L'Her ("duraznillo negro") y *Senecio selloi* Spreng ("senecio") sobre la peroxidación de membranas de microsomas de hepatocitos. 1° Congreso Regional de Toxicología Veterinaria. Montevideo, Uruguay, 7 y 8 de diciembre de 2017. Libro de resúmenes: Pág. 10. Con referato.
- Barberón J, Becerra V, Ventura M, Leaden P, Leggieri M, Zeinsteger P, Palacios. Mitochondria rat liver peroxidation: effect of a methanolic extract of *Cestrum parqui* L'Herit. *BIOCELL* 43 (suppl. 3). XX Annual Meeting of the Argentine Biology Society - XVII Meeting of the Uruguayan Society of Biosciences (SUB). Second Biology Meeting of the River Plate. "Nanobiotechnology: small solutions for big problems" Pág. 15. Con referato. ISSN 0327- 9545, ISSN 1667-5746 (online version).

Congresos internacionales

- Barberón J, Gambaro R, Padula G, Seoane A, Ventura B, Leaden P, Palacios A, Zeinsteger P. Effects of a leaf extracts from the poisonous plant *Cestrum parqui* L'Herit ("duraznillo negro", Solanaceae) on genotoxicity. 20th World Congress of the International Society on Toxinology - "Toxinology in the 21st century: Public health impact from basic, translational and clinical sciences". Pág 110. Con referato.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----------|
| Portada | I |
| Dedicatoria | II |
| Agradecimientos | III |
| Publicaciones parciales del trabajo de tesis | IV |
| Lista de abreviaturas | X |
| Lista de figuras | XIII |
| Lista de tablas | XVI |
| Resumen | 1 |
| Summary | 2 |
| Capítulos | |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 3 |
| I.1. Generalidades | 3 |
| I.2. Compuestos químicos presentes en las plantas | 4 |
| I.2.1. Terpenos | 8 |
| I.2.3. Compuestos fenólicos | 11 |
| I.2.3. Glicósidos | 14 |
| I.2.4. Alcaloides | 16 |
| I.3. Factores que condicionan las intoxicaciones causadas por plantas | 17 |
| I.3.1. Hambre | 17 |
| I.3.2. Sed | 18 |
| I.3.3. Desconocimiento | 18 |
| I.3.4. Acceso a las plantas | 18 |
| I.3.5. Dosis tóxica | 19 |
| I.3.6. Período de ingestión | 19 |
| I.3.7. Variaciones en la toxicidad | 20 |
| I.4. Clasificación de plantas tóxicas para el ganado bovino | 20 |
| I.5. Particularidades sobre las intoxicaciones provocadas por plantas hepatotóxicas | 22 |
| I.6. Plantas hepatotóxicas agudas. | 23 |
| I.6.1. Familia Solanaceae, especie <i>Cestrum parqui</i> | 23 |
| I.6.1.1. Características botánicas y distribución geográfica | 23 |

| | |
|--|----|
| I.6.1.2. Principios activos presente en la planta | 25 |
| I.6.1.3. Signos asociados a la intoxicación | 26 |
| I.6.2. Familia Asteraceae, especie <i>Pascalía glauca</i> | 27 |
| I.6.2.1. Características botánicas y distribución geográfica | 27 |
| I.6.2.2. Principios activos presentes en la planta | 29 |
| I.6.2.3. Signos asociados a la intoxicación | 30 |
| I.7. Mecanismo de acción de los atractilósidos presentes en <i>C. parqui</i> y <i>P. glauca</i> | 31 |
| I.8. Radicales libres y peroxidación de membranas | 32 |
| I.9. Compuestos de las plantas capaces de promover la peroxidación de membranas a través de la formación de radicales libres | 38 |
| I.10. Estudios sobre genotoxicidad de plantas tóxicas | 39 |
| I.11. Hipótesis | 40 |
| I.12. Objetivos | 40 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| II.1. Material vegetal | 41 |
| II.1.1. Material estudiado | 41 |
| II.2. Obtención de los extractos | 42 |
| II.3. Análisis fitoquímico | 43 |
| II.3.1. Fracción A | 43 |
| II.3.1.1. Flavonoides | 43 |
| II.3.1.2. Taninos y OH fenólicos | 43 |
| II.3.1.3. Lípidos | 44 |
| II.3.1.4. Glúcidos | 44 |
| II.3.2. Fracción B | 45 |
| II.3.2.1. Esteroides y triterpenos | 45 |
| II.3.2.2. Antraquinonas | 45 |
| II.3.3. Fracción C | 45 |
| II.3.3.1. Alcaloides | 45 |
| II.3.3.2. Cardenólidos | 46 |
| II.3.3.3. Leucoantocianinas | 46 |
| II.3.4. Reacciones directas | 46 |

| | |
|---|-----|
| II.4. Ensayos de peroxidación de membranas biológicas | 47 |
| II.4.1. Animales de laboratorio | 47 |
| II.4.2. Determinación de proteínas | 47 |
| II.4.3. Obtención de homogenatos y mitocondrias | 49 |
| II.4.4. Obtención de microsomas | 49 |
| II.4.5. Ensayos de peroxidación de microsomas y mitocondrias | 50 |
| II.5. Ensayos de genotoxicidad | 50 |
| II.5.1. Ensayo de electroforesis de una sola célula (Ensayo cometa) | 50 |
| II.5.2. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (CBMN) | 55 |
| II.6. Análisis estadístico | 59 |
| III. RESULTADOS | 60 |
| <i>III.1. Cestrum parqui</i> | 60 |
| III.1.1. Fitoquímica | 60 |
| III.1.2. Ensayos de peroxidación | 66 |
| III.1.3. Ensayo de electroforesis de una sola célula | 70 |
| III.1.4. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis | 71 |
| <i>III.2. Pascalia glauca</i> | 74 |
| III.2.1. Fitoquímica | 74 |
| III.2.2. Ensayos de peroxidación | 81 |
| III.2.3. Ensayo de electroforesis de una sola célula | 84 |
| III.2.4. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis | 85 |
| IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 88 |
| IV.1. Discusión | 88 |
| IV.1.1. Fitoquímica | 88 |
| IV.1.1.1. Fitoquímica de <i>Cestrum parqui</i> L'Her y relación con el poder antioxidante | 88 |
| IV.1.1.2. Fitoquímica de <i>Pascalia glauca</i> Ortega y relación con el poder antioxidante | 93 |
| IV.1.2. Ensayos de peroxidación medidos por quimioluminiscencia | 98 |
| IV.1.3. Genotoxicidad | 103 |
| IV.2. Conclusiones | 108 |
| V. BIBLIOGRAFÍA | 109 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPF: agarosa de bajo punto de fusión

APFN: agarosa de punto de fusión normal

ADP: adenosín difosfato

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina sérica bovina

°C: grados Celsius

C: carbono

CAA: carrier ADP/ATP

CHO: chinese hamster ovary

CL: cariolisis

cm: centímetro

CN: control negativo

CP: control positivo

CPM: cuentas por minuto

CR: cariorrexis

C DMSO: control dimetilsulfóxido

DMSO: dimetilsulfóxido

ES: error estándar

g: gramo

GR: glóbulo rojo

h: hora

H₂O_d: agua destilada

IDN: índice de división nuclear

Kg: kilogramo

L: radicales lipídicos primarios

LH: moléculas lipídicas

L^{\bullet} : radical lipídico carbono-centrado

LO \bullet : radicales alcoxi

LOO \bullet : radicales hidroperóxido

LOO $\overset{\ominus}{\bullet}$: radical peroxilo lipídico

LSD: Least Significant Difference

m: metro

M: molar

mA: miliamper

MDA: malondialdehído

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

mmol: milimol

Mni: frecuencia de micronúcleos

N: Normalidad

nm: nanómetro

NPBs: puentes nucleoplásmicos

NBDUs: brotes nucleares

PUFA: ácidos grasos polinosaturados

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

OH: hidroxilo

R[•]: radical

ROS: especies reactivas del oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

μg: microgramo

Tris: 2-amino-2 hidroximetil propano-1,3 diol

μl: microlitro

v/v: volumen en volumen

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | PÁGINA |
|---|---------------|
| 1. Elementos del metabolismo primario de las plantas y su relación con el metabolismo secundario | 5 |
| 2. Origen de metabolitos secundarios de las plantas y su relación con el metabolismo primario | 6 |
| 3. Estructura del isopreno | 8 |
| 4. Formación de terpenos por reacciones de dimerización | 9 |
| 5. Estructura del escualeno | 10 |
| 6. Formación de isopentenil bifosfato en la célula vegetal | 11 |
| 7. Estructura de una procianidina oligomérica y ácido gálico | 13 |
| 8. Estructura química de durrina, glicósido cianogénico | 14 |
| 9. Estructura de la α saponina | 15 |
| 10. Estructura química general de los cardenólidos | 15 |
| 11. Detalle de flores y hojas de <i>Cestrum parqui</i> L'Herit | 24 |
| 12. Fruto de <i>Cestrum parqui</i> L'Herit | 24 |
| 13. Distribución mundial de <i>Cestrum parqui</i> L'Herit | 25 |
| 14. Estructura química de parquina y carboxiparquina | 26 |
| 15. Detalle de las nervaduras y de los “dientes” en la base de una hoja de <i>Pascalía glauca</i> Ortega. | 27 |
| 16. Detalle de la flor de <i>Pascalía glauca</i> Ortega. | 28 |
| 17. Distribución mundial de <i>Pascalía glauca</i> Ortega. | 28 |
| 18. Estructura general de un atractilósido | 29 |
| 19. Intoxicación natural por ingestión de <i>Pascalía glauca</i> en bovino | 30 |
| 20. Intoxicación natural por ingestión de <i>Pascalía glauca</i> Ortega en bovino. Necrosis coagulativa hemorrágica, caracterizada por picnosis, cariorrexis y cariólisis | 31 |
| 21. Representación esquemática del mecanismo de transporte de solutos por el carrier ADP/ATP entre el citoplasma y la matriz mitocondrial | 32 |
| 22. Representación esquemática de la peroxidación del ácido docosapentanoico 22:5 (n-6), inducida por radicales hidroxilo | 36 |
| 23. Esquema de marcha fitoquímica | 42 |
| 24. Clasificación de los niveles de daño citomolecular. | 54 |
| 25. Diagrama de eventos genotóxicos: micronúcleos, puentes periplásmicos y brotes nucleares | 57 |
| 26. Reacción de Shinoda positiva para la identificación de flavonoides | 61 |
| 27. Reacción de cloruro férrico positiva para la identificación de $-OH$ Fenólicos | 61 |
| 28. Reacción de gelatina positiva para la identificación de taninos | 62 |
| 29. Reacción de vapores de yodo positiva para la identificación de lípidos | 62 |
| 30. Reacción de fenol al 5% + H_2SO_4 concentrado positiva para la identificación de glúcidos | 63 |

| | |
|---|----|
| 31. Reacción de Liebermann-Burchard positiva para la identificación de esteroides y negativa para la identificación de triterpenos | 63 |
| 32. Reacción de Bornträger negativa para la identificación de Antraquinonas | 64 |
| 33. Reacción de Dragendorff positiva para la identificación de alcaloides | 64 |
| 34. Reacción de Legal negativa para la identificación de cardenólidos | 65 |
| 35. Reacción de Roseinheim negativa para la identificación de Leucoantocianinas | 65 |
| 36. Reacción de agitación para obtención de espuma, positiva para la identificación de saponinas | 66 |
| 37. Peroxidación (quimioluminiscencia) de microsomas de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Cestrum parqui</i> en función del tiempo (180 min) | 67 |
| 38. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de microsomas de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Cestrum parqui</i> | 68 |
| 39. Peroxidación (quimioluminiscencia) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Cestrum parqui</i> en función del tiempo (180 min) | 69 |
| 40. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Cestrum parqui</i> | 70 |
| 41. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el ensayo cometa. | 71 |
| 42. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el índice de división nuclear. | 72 |
| 43. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la frecuencia de micronúcleos | 73 |
| 44. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de puentes periplásmicos | 73 |
| 45. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de brotes nucleares | 74 |
| 46. Reacción de Shinoda positiva para la identificación de flavonoides | 75 |
| 47. Reacción de cloruro férrico positiva para la identificación de -OH Fenólicos | 76 |
| 48. Reacción de gelatina positiva para la identificación de taninos | 76 |
| 49. Reacción de vapores de yodo positiva para la identificación de lípidos | 77 |
| 50. Reacción de fenol al 5% + H ₂ SO ₄ positiva para la identificación de glúcidos | 77 |
| 51. Reacción de Liebermann-Burchard positiva para la identificación de esteroides y negativa para la identificación de triterpenos | 78 |
| 52. Reacción de Bornträger negativa para la identificación de Antraquinonas | 78 |

| | |
|--|----|
| 53. Reacción de Dragendorff positiva para la identificación de alcaloides | 79 |
| 54. Reacción de Legal negativa para la identificación de cardenólidos | 79 |
| 55. Reacción de Roseinheim negativa para la identificación de Leucoantocianinas | 80 |
| 56. Reacción de agitación para obtención de espuma, positiva para la identificación de saponinas | 80 |
| 57. Peroxidación (quimioluminiscencia) de microsomas de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Pascalía glauca</i> en función del tiempo (180 min) | 81 |
| 58. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de microsomas de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Pascalía glauca</i> . | 82 |
| 59. Peroxidación (quimioluminiscencia) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Pascalía glauca</i> en función del tiempo (180 min) | 82 |
| 60. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Pascalía glauca</i> . | 83 |
| 61. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el ensayo cometa. | 84 |
| 62. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el índice de división nuclear. | 85 |
| 63. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la frecuencia de micronúcleos | 86 |
| 64. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de puentes periplásmicos. | 87 |
| 65. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de brotes nucleares | 87 |

LISTA DE TABLAS

| TABLA | PÁGINA |
|---|--------|
| 1. Principales tipos de flavonoides | 12 |
| 2. Resultados de la fitoquímica de las tres fracciones del extracto metanólico de <i>Cestrum parqui</i> . | 60 |
| 3. Resultados obtenidos para el ensayo cometa, control negativo, tratamientos con concentraciones de <i>Cestrum parqui</i> , control positivo y control con dimetilsulfóxido. | 70 |
| 4. Resultados obtenidos para el índice de división nuclear, frecuencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, y brotes nucleares generados, control negativo, tratamientos con concentraciones de <i>Cestrum parqui</i> , control positivo y control con dimetilsulfóxido. | 71 |
| 5. Resultados de la fitoquímica de las tres fracciones del extracto metanólico de <i>Pascalía glauca</i> . | 75 |
| 6. Resultados obtenidos para el ensayo cometa, control negativo, tratamientos con concentraciones de <i>Pascalía glauca</i> , control positivo y control con dimetilsulfóxido. | 84 |
| 7. Resultados obtenidos para el índice de división nuclear, frecuencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, y brotes nucleares generados por control negativo, tratamientos con concentraciones de <i>Pascalía glauca</i> , control positivo y control con dimetilsulfóxido. | 85 |

EFFECTOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN DE MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS HEPÁTICAS DE RATAS WISTAR, ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y GENOTOXICIDAD DE *Cestrum parqui* L'HER (“DURAZNILLO NEGRO”, SOLANACEAE) Y *Pascalía glauca* ORTEGA (“SUNCHILLO”, ASTERACEAE).

RESUMEN

Las plantas tóxicas de importancia agropecuaria son aquellas que, ingeridas por los animales domésticos, causan daño a su salud y pueden provocar la muerte. De importancia en Medicina Veterinaria son *Cestrum parqui* L'Her (“duraznillo negro”, Solanaceae) y *Pascalía glauca* Ortega (“sunchillo”, Asteraceae), ambas hepatotóxicas. La toxicidad se debe a compuestos parquina e hidroxiparquina para *Cestrum parqui* y un atractilósido en *Pascalía glauca*, capaces de inhibir el sistema carrier ADP-ATP. Se plantea como hipótesis que los compuestos químicos presentes en *Cestrum parqui* y *Pascalía glauca* se comportan como prooxidantes de membranas celulares, provocando la peroxidación de membranas de microsomas y mitocondrias hepáticas, aumentando el estrés oxidativo y que ciertos principios químicos de ambas plantas poseen efectos genotóxicos en células CHO. Los análisis fitoquímicos cualitativos demostraron presencia de flavonoides, taninos, hidroxilos polifenólicos, lípidos, glúcidos, esteroides, alcaloides, saponinas, y ausencia de cardenólidos y leucoantocianinas. En los estudios de peroxidación con extractos metanólicos de *Cestrum parqui* y *Pascalía glauca* se observó que poseen capacidad antioxidante atribuible a la presencia de compuestos polifenólicos como flavonoides y taninos, resultando más protegidas las membranas mitocondriales versus microsomales. Los estudios de genotoxicidad realizados demuestran que, en las condiciones de trabajo realizadas, los extractos de ambas plantas poseen capacidad genotóxica dosis dependiente.

PALABRAS CLAVE: *Cestrum parqui*, duraznillo negro, *Pascalía glauca*, sunchillo, estrés oxidativo, toxicidad.

INGLÉS

EFFECTS ON THE PEROXIDATION OF LIVER MITOCHONDRIA AND MICROSOMES OF WISTAR RATS, PHITOCHEMICAL ANALYSIS AND GENOTOXICITY OF *Cestrum parqui* L'HER (“YELLOW CESTRUM”, SOLANACEAE) AND *Pascalía glauca* (“SUNCHILLO”, ASTERACEAE).

SUMMARY

Poisonous plants of agricultural importance are those that, when ingested by domestic animals, cause damage to their health and may cause death. Of importance in Veterinary Medicine are *Cestrum parqui* L'Her (“yellow cestrum”, Solanaceae) and *Pascalía glauca* Ortega (“sunchillo”, Asteraceae), both hepatotoxic. Toxicity is due to parquine and hydroxyparquine for *Cestrum parqui* and an atractyloside for *Pascalía glauca*, compounds capable of inhibiting the ADP-ATP carrier system. We hypothesize that chemical compounds present in *Cestrum parqui* and *Pascalía glauca* behave as pro-oxidants of cell membranes, causing peroxidation of microsomes and liver mitochondria membranes, increasing oxidative stress, and that some compounds may cause genotoxic effects on CHO cells. Qualitative phytochemical analysis demonstrated the presence of flavonoids, tannins and polyphenolic hydroxyls, lipids, carbohydrates, steroids, alkaloids and saponins, and absence of cardenolides and leucoanthocyanins. In the peroxidation studies with methanolic extracts of *Cestrum parqui* and *Pascalía glauca*, it was observed that they have antioxidant capacity attributable to polyphenolic compounds such as flavonoids and tannins, being more protected mitochondrial vs microsomal membranes. With regard to the genotoxicity analysis, results indicate that, under our working conditions, extracts from both plants have dose-dependent genotoxic capacity.

KEY WORDS: *Cestrum parqui*, yellow cestrum, *Pascalía glauca*, sunchillo, oxidative stress, toxicity.

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades

Numerosos compuestos de origen natural son capaces de producir intoxicaciones en el hombre y en los animales. Entre éstos, los que derivan del reino vegetal pueden producir lesiones de diversa gravedad al ingresar al organismo, especialmente cuando lo hacen por la vía digestiva (Bruneton, 2001). Para los animales domésticos las malezas tóxicas constituyen un ejemplo de especial interés (Datta *et al.*, 1978; López *et al.*, 1991).

Se definen como plantas tóxicas de importancia agropecuaria aquellas que, ingeridas por los animales domésticos en forma accidental o bajo situaciones extremas, causan daños a la salud y pueden provocar la muerte (Tokarnia *et al.*, 1979). En los animales de abasto las intoxicaciones de origen vegetal suelen ocurrir en aquellas épocas del año en que la oferta forrajera disminuye, debido principalmente a la escasez de precipitaciones. La falta de lluvias en el invierno produce una disminución en el crecimiento de pasturas naturales y cultivadas destinadas a la alimentación de diferentes especies de ganado; el hambre genera en ellos una alteración en la selectividad y palatabilidad, lo que deriva en el consumo de especies vegetales que normalmente no son ingeridas (Tokarnia *et al.*, 1979). Por el contrario, en condiciones normales estas plantas son rechazadas por los animales debido al mal olor y sabor desagradable que poseen, o porque resultan astringentes, coriáceas, hirsutas, todas propiedades utilizadas para la defensa contra insectos y herbívoros (Bruneton, 2001; Kubo *et al.*, 2003; Konno *et al.*, 2004). El médico veterinario que se dedica a grandes especies frecuentemente debe asistir a pacientes intoxicados debido a la ingestión de vegetales tóxicos, o confirmar casos post-mortem. Éstos desde el punto de vista clínico son muchas veces

desconcertantes, y las lesiones anatomopatológicas pueden resultar variadas e inconstantes (Odrizola *et al.*, 1994; Méndez y Riet-Correa, 2002).

Con el fin de reducir el riesgo de intoxicación, los herbívoros utilizan varias estrategias fisiológicas, etológicas, o de adaptación. Existen al menos seis destinadas a reducir la toxicidad de las plantas: 1) evitando o reduciendo la ingestión de fitotoxinas mediante cambios en la selección de la dieta; 2) seleccionando una dieta mixta, para diluir el efecto de toxinas específicas; 3) consumiendo la toxina en forma cíclica o de manera intermitente para evitar el daño permanente; 4) eliminando la toxina una vez consumida; 5) conjugando, degradando o detoxificando la toxina; 6) tolerándola una vez consumida. Estas categorías no son excluyentes entre sí, existiendo un solapamiento sustancial. En general las tres primeras incluyen la reducción o eliminación del consumo de la fitotoxina a través de cambios en el comportamiento, mientras que las restantes involucran cómo los animales manejan los principios tóxicos en su organismo cuando son incorporados (Provenza *et al.*, 1992; Forbes, 1998).

I.2. Compuestos químicos presentes en las plantas

El conjunto de reacciones químicas que tiene lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, nitrógeno y de la energía termina formando parte de moléculas comunes a todas las células y que son necesarias para su funcionamiento. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y con funciones comunes. Son los denominados *metabolitos primarios* (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009) (Fig. 1).

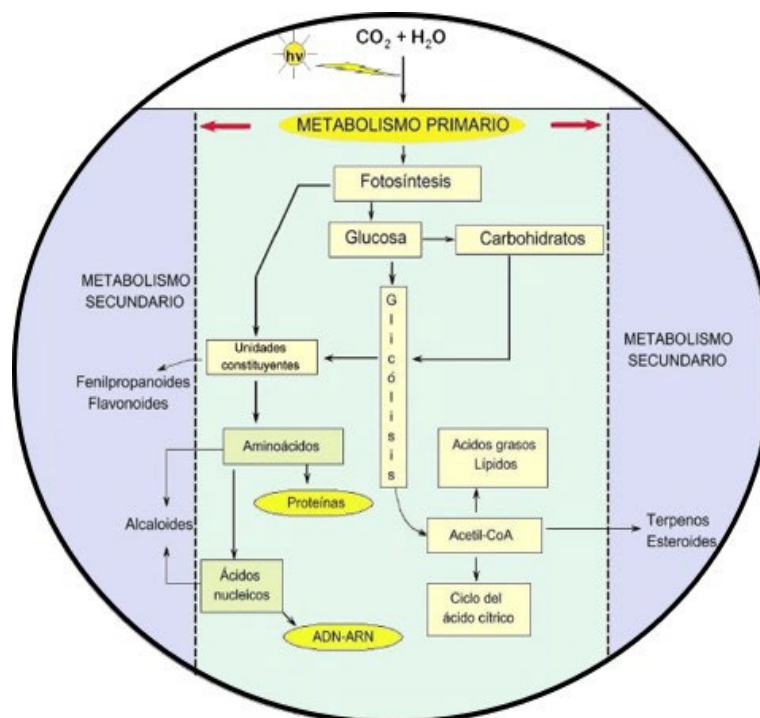


Figura 1. Elementos del metabolismo primario de las plantas y su relación con el metabolismo secundario (Tomado y modificado de Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Por otra parte, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía para la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, que en principio parecen no tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan *metabolitos secundarios*, *productos secundarios* o *productos naturales* (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011) (Fig. 2). Además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción circunscripta a un determinado número de especies de plantas, a una familia. Son, en definitiva, compuestos derivados del metabolismo primario, pero con distribución limitada en el reino vegetal, restringidos a un grupo taxonómico particular (Shilpa *et al.*, 2010).

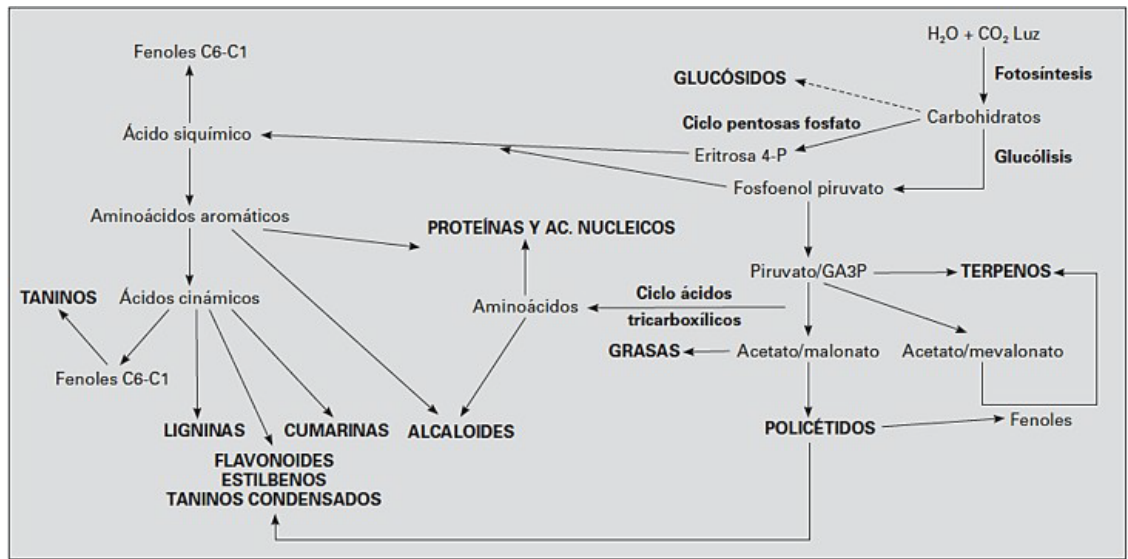


Figura 2. Origen de metabolitos secundarios de las plantas y su relación con el metabolismo primario (Tomado y modificado de Azcón-Nieto y Talón, 2013).

En épocas pasadas se pensaba que estas sustancias se producían sin que tuvieran funciones específicas en las plantas; sin embargo, luego se demostró que muchas poseen altos rendimientos y que cumplen múltiples funciones (Wink, 2007). Si bien no tienen una función aparente en el metabolismo primario, sí poseen implicancia ecológica, cumpliendo roles en la defensa contra herbívoros, o bien comportándose como sustancias alelopáticas contra el efecto nocivo de virus, hongos y bacterias (Jones y Takemoto, 2004; Ruffinengo *et al.*, 2005; Chisholm, 2006).

En el caso particular de la herbivoría (acción de los animales sobre las plantas, referida al consumo), algunos compuestos tienen función protectora frente a depredadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. Incluso pueden intervenir en mecanismos de defensa frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. O bien, por el contrario, algunos productos del metabolismo secundario actúan como atrayentes de insectos polinizadores, formando parte de la constitución química de pigmentos que proporcionan color, aromas y sabores a flores y frutos, jugando así un papel esencial en la reproducción vegetal, atrayendo a insectos polinizadores o bien animales que utilizan dichas partes vegetales como fuente de alimento, en definitiva contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas (Bourgaud *et al.*, 2001; Vivanco *et al.*, 2005).

Otros cumplen una función fisiológica, tal es el caso de los alcaloides o las pectinas, que pueden servir para el transporte de nitrógeno y diversas sustancias de almacenamiento. En el caso de algunos compuestos fenólicos, como los flavonoides, actúan como protectores contra rayos ultravioletas (Wink, 2007). Muchos de ellos, además, constituyen una fuente importante de principios activos para la formulación de medicamentos y de valiosos compuestos químicos (Goossens *et al.*, 2003).

Los metabolitos secundarios se pueden agrupar en cuatro clases principales:

- Terpenos, entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos, que incluyen a cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos, donde se hallan saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides, con diferentes estructuras químicas y funciones.

A continuación, se presentan las principales características de cada grupo.

I.2.1. Terpenos

En ocasiones citados como terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da origen tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides (pigmentos como carotenos y xantofilas), clorofilas y plastoquinonas (para la fotosíntesis), ubiquinonas (para la respiración celular) y esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol, de gran importancia en la estructura de membranas biológicas eucariotas), derivados de esteroides (glicósidos cardíacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas) (Azcón Nieto y Talón, 2008; Ávalos García y Pérea-Urria, 2009; Alberts *et al.*, 2016; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Stryer *et al.*, 2013). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno (Autino *et al.*, 2013; Azcón Nieto y Talón, 2008). A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial. Suelen ser insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C, Fig. 3).

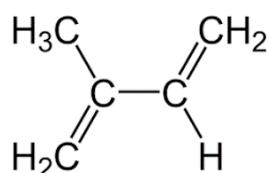


Figura 3. Estructura del isopreno (Tomado y modificado de Stryer *et al.*, 2013).

Se clasifican por el número de unidades de isopreno que contienen en monoterpenos (poseen 10 átomos de C como dos unidades de isopreno), sesquiterpenos (15 átomos de C, tres unidades de isopreno), diterpenos (20 carbonos, cuatro unidades de isopreno), triterpenos (30 C), tetraterpenos (40 C). Cuando poseen más de ocho unidades de isopreno se denominan politerpenos (Fig. 4).

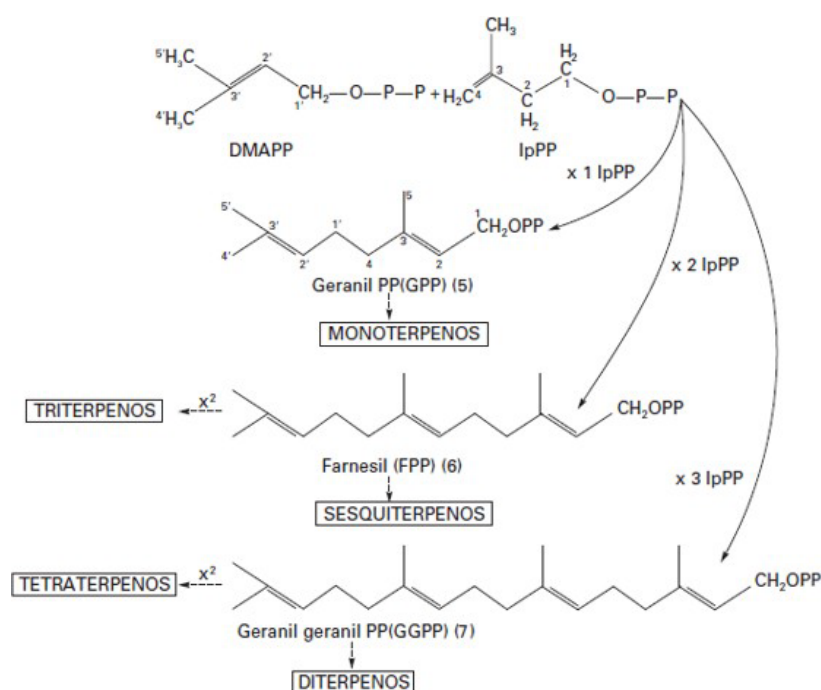


Figura 4. Formación de terpenos por reacciones de dimerización (Tomado y modificado de Azcón-Nieto y Talón, 2013).

Se pueden mencionar algunos ejemplos considerando la clasificación. Entre los monoterpenos se pueden mencionar al geraniol y el limoneno; para el caso de sesquiterpenos, el farnesol; en los triterpenos, por ejemplo, se encuentran esteroides y esterolés derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos (Fig. 5); y en los tetraterpenos se encuentran dentro de este grupo los licopenos y los carotenoides.

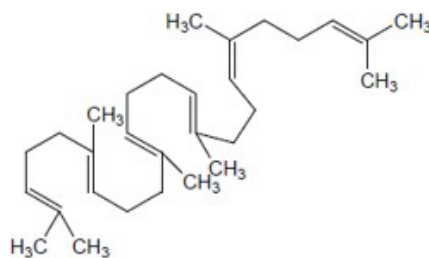


Figura 5. Estructura del escualeno (Tomado y modificado de Autino *et al.*, 2013).

Los esteroides que contienen un grupo alcohol se denominan esterol (es el caso de casi todos los esteroides vegetales), los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol. La función principal de los esteroides en las plantas es formar parte de la estructura de las membranas celulares y determinar su viscosidad y su estabilidad. Algunos triterpenos se encuentran formando parte de esteroides en forma de glicósidos, que poseen importantes funciones en medicina y en la industria (cardenólidos y saponinas) (Azcón-Nieto y Talón, 2008).

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por distintas rutas metabólicas. El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranyl difosfato (precursor de monoterpenos), farnesil difosfato (precursor de sesquiterpenos), y geranyl difosfato (precursor de diterpenos) (Ávalos García y Pérea-Urria, 2009) (Fig. 6).

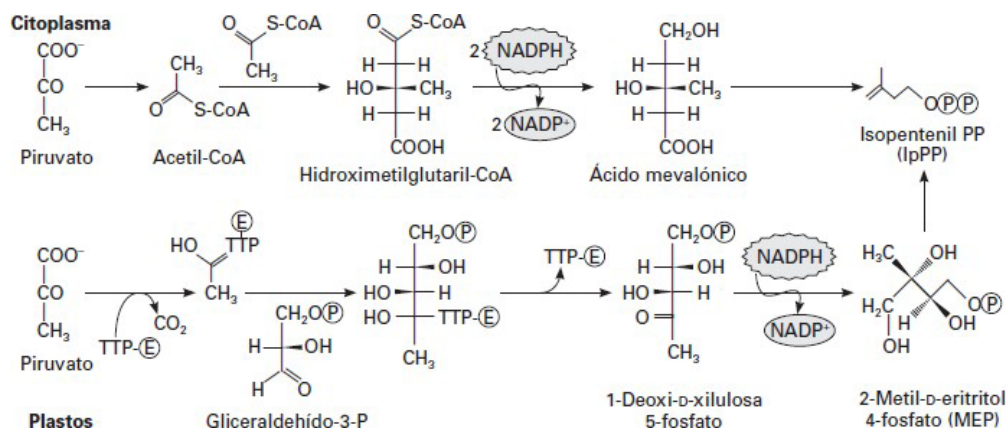


Figura 6. Formación del isopentenil bifosfato en la célula vegetal (Tomado y modificado de Azcón-Nieto y Talón, 2013).

I.2.2. Compuestos fenólicos

En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos pueden formar parte tanto del metabolismo primario como del secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, anillo aromático con un grupo hidroxilo. Estas sustancias, derivadas del fenol, reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides (Azcón Nieto y Talón 2008; Autino *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas (ácidos fenólicos), hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos de síntesis están implicados en las interacciones planta-herbívoro. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido cafeico, cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Ávalos García y Pérea-Urria, 2009; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

En el caso de los flavonoides, su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente carbonado, siendo los principales las antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas (Tabla 1). Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación. Las antocianinas, por ejemplo, son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos y por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. En las flores también se encuentran flavonas y flavonoles que absorben a longitudes de onda cortas que hacen que no sean visibles para el ojo humano. Sin embargo, los insectos que ven en el rango del UV responden a flavonas y flavonoles como señales de atracción (Vivanco *et al.*, 2005; Taiz y Zeiger, 2006).

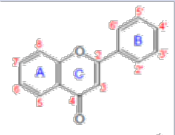
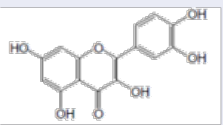
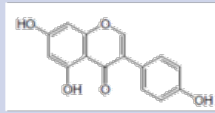
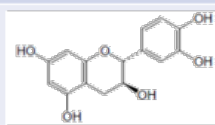
| Flavonoides | Ejemplos | Estructura química |
|-------------------|------------|---|
| Flavonas | Flavona |  |
| Flavonoles | Quercetina |  |
| Isoflavonas | Genistéina |  |
| Proantocianidinas | Catequina |  |

Tabla 1. Principales tipos de flavonoides (Tomado y modificado de Autino *et al.*, 2013).

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a azúcares o polialcoholes mediante uniones éster que, en caso de tomar contacto con proteínas, las desnaturalizan. El nombre procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel de animales en cuero (durante el curtido se unen al colágeno, aumentando su resistencia al calor, al agua y a la acción de microorganismos). Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables (Fig. 7). Los condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidos por enlaces C-C que no pueden ser hidrolizados, pero sí oxidados por un ácido fuerte para dar proantocianidinas, constituidas por cadenas de procianidinas oligoméricas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente. Debido a esta capacidad de unirse a proteínas, en ocasiones se comportan como toxinas. También actúan como repelentes contra herbívoros, ya que los animales suelen evitar plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Por el contrario, se ha demostrado que algunos participan en la prevención de enfermedades metabólicas (Manach *et al.*, 2004; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2009).

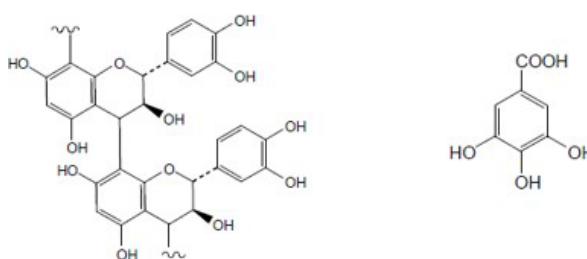


Figura 7. A la izquierda se muestra parte de la estructura de una procianidina oligomérica (tanino condensado) y a la derecha el ácido gálico, constituyente de taninos hidrolizables (Tomado y modificado de Autino *et al.*, 2013).

I.2.3. Glicósidos

Son metabolitos secundarios de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (Fig. 8). Existen tres grupos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar (Ávalos García y Pérea-Urria, 2009; Aungustin *et al.*, 2011).

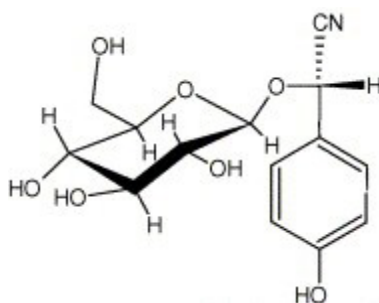


Figura 8. Estructura química de durrina, glicósido cianogénico presente en algunas plantas potencialmente tóxicas para rumiantes, por ejemplo *Sorghum halepense* (L.) Pers. (“sorgo de Alepo”)

(Tomado de Johansen *et al.*, 2007).

Las saponinas (Fig. 9) se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por lo tanto triterpenoides o esteroideos que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Azcón Nieto y Talón, 2008).

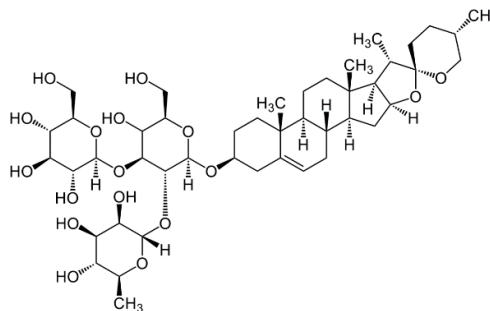


Figura 9. Estructura de la α saponina. (Tomado y modificado de Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Los glicósidos cardíacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, también tienen propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona (Fig. 10). Se encuentran de forma natural como glicósidos o agliconas. En Medicina Humana y Veterinaria han sido de gran uso en el pasado para el tratamiento de enfermedades como la insuficiencia cardíaca congestiva; en la actualidad se encuentran en desuso (debido particularmente a su margen de seguridad estrecho), con solo algunas indicaciones terapéuticas (antiarrítmicos). Existen algunas plantas que los sintetizan en gran cantidad y son, por lo tanto, especies vegetales muy peligrosas si son ingeridas en forma accidental por los animales (Fazzio *et al.*, 2007; Di Paolo *et al.*, 2010).

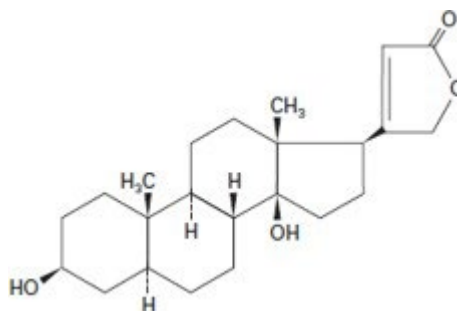


Figura 10. Estructura química general de los cardenólidos (Tomado y modificado de Autino *et al.*, 2013).

I.2.4. Alcaloides

Son una familia numerosa de metabolitos secundarios que tienen en común tres características: la mayoría son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. En el caso particular de la solubilidad, la de los alcaloides bases y de sus respectivas sales es opuesta: mientras las sales son hidrosolubles (por ejemplo, citrato de nicotina), el correspondiente alcaloide al estado de base presenta mayor afinidad por solventes no polares (solventes orgánicos); estas particularidades son utilizadas durante los procesos de extracción (Vágújfalvi, 1960).

Suelen ser heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina. Se encuentran en aproximadamente el 20% de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Cárdenas *et al.*, 2015; Fahmy *et al.*, 2019). El nitrógeno a menudo forma parte de un anillo heterocíclico. Como su nombre lo indica, se comportan como bases (*alcaloide “parecido a álcali”*) y pueden formar sales en medio ácido, también pueden existir libres, al estado de sales, o como N-óxidos (Autino *et al.*, 2013). Son por lo general ópticamente activos, por presentar al menos un carbono asimétrico en su estructura. Reaccionan positivamente con ciertos reactivos denominados “reactivos generales de alcaloides” (Mayer, Dragendorff, Burchard, etc.), dando precipitados. Se encuentran relacionados biosintéticamente con los aminoácidos y cumplirían en vegetales funciones de defensa, ya que suelen ser compuestos de sabor amargo y que por lo tanto desalientan la herbivoría (Granados *et al.*, 2008).

Según su composición elemental se los clasifica en:

- Alcaloides ternarios (no oxigenados): líquidos oleosos, volátiles, arrastrables con vapor de agua. Ej.: nicotina, conína.
- Alcaloides cuaternarios (oxigenados): sólidos, cristalizables, fijos. A este grupo pertenecen la mayoría de los alcaloides.

Muchos de ellos tienen importancia farmacológica ya que pueden provocar cambios en mecanismos fisiológicos (replicación del ADN, transmisión del impulso nervioso, inhibición de la mitosis, etc.).

I.3. Factores que condicionan las intoxicaciones causadas por plantas

Luego de conocer la gran variedad de principios activos presentes en las plantas, resulta importante recordar aquellas con potencialidad tóxica. Se debe tener presente, como se ha mencionado anteriormente, que estos metabolitos juegan un papel importante contra la herbivoría, constituyendo así mecanismos de defensa. Entre los factores que inciden sobre las intoxicaciones de origen vegetal se citan los siguientes:

I.3.1. Hambre

Este es probablemente el factor más importante, debido a que muchas plantas son consumidas solamente cuando existe carencia de forraje o bien luego de períodos de privación de alimentos, lo que lleva a la ingestión de plantas poco palatables. Cuando existe poca oferta forrajera (principalmente durante el invierno y debido a la escasez de lluvias) algunas plantas tóxicas permanecen verdes; es el caso de los “senecios”, como *Senecio bonariensis* Hook & Arn. y *Senecio grisebachii* Baker, malezas conocidas en Argentina como “margarita de campo” o “primavera”, que son consumidas durante los meses de bajas temperaturas y cuando la concentración de principios activos es elevada.

I.3.2. Sed

Este factor se asocia con aquellos animales que han sido transportados recientemente a través de largas distancias. A su llegada ingieren gran cantidad de agua, lo que provoca que el gusto se altere en forma transitoria, perdiendo así la capacidad de selección de los alimentos; de esta manera ingieren malezas con mal sabor, olor y en algunos casos tóxicas. Se puede mencionar, por ejemplo, a la planta hepatotóxica *Cestrum parqui* L' Herit, vegetal que posee sabor y olor desagradables, pero que bajo condiciones de sed (y hambre) puede ser consumida por los animales, con desenlace fatal.

I.3.3. Desconocimiento

Existen determinadas plantas que son consumidas solamente por animales que las desconocen, porque fueron criados en lugares donde éstas no se encuentran (zonas de cría). Al ser reubicados en zonas de engorde, donde los vegetales tóxicos proliferan, un número importante de cabezas puede resultar intoxicado (Riet-Correa *et al.*, 1993) |Es el caso del “mio-mio” o “romerillo” (*Baccharis coridifolia* DC.), planta que posee tricotecenos debido a la asociación simbiótica con hongos de la especie *Myrothecium* spp., productores de estas toxinas.

I.3.4. Acceso a las plantas

Algunos vegetales solo causan intoxicación cuando, por alguna causa poco frecuente, los animales tienen acceso a ellas. Este es el caso de la intoxicación provocada por el “laurel rosa” o “adelfa” (*Nerium oleander* L.), cuando estos arbustos son podados y los animales pueden acceder al material vegetal. Estas plantas poseen glicósidos cardiotónicos en gran concentración.

Por otra parte, en la actualidad la creciente demanda de carne bovina lleva a los productores a criar animales en zonas consideradas no tradicionales (como áreas inundables, por ejemplo) en las que crecen especies tóxicas que antiguamente no eran accesibles (Villar, 2007).

I.3.5. Dosis tóxica

La cantidad de planta necesaria para causar intoxicación puede ser muy variable cuando se comparan distintas especies entre sí. La mayor toxicidad la posee el “romerillo”, *Baccharis coridifolia*, a razón de 0,25-0,5 g de planta verde/kg de peso vivo en el otoño (Begeres de Almeida *et al.*, 2009). Hay otras especies que, por el contrario, tienen que ser ingeridas en grandes cantidades para que se produzca la intoxicación, como por ejemplo el “yuyo colorado” (*Amaranthus quitensis* H.B.K.), a razón de 440 g de planta verde/kg de peso vivo (Riet-Correa *et al.*, 1993). Hay otros vegetales que causan intoxicación solamente cuando forman parte de la casi totalidad de la dieta, como las leguminosas que producen timpanismo o hiperestrogenismo (*Trifolium* spp., “trébol”).

I.3.6. Período de ingestión

Existen algunas especies que producen cuadros de intoxicación cuando son consumidas por única vez, como el “mio-mio”, o el “duraznillo negro”; algo similar ocurre con plantas cianogénicas (“sorgo de Alepo”), o leguminosas que causan meteorismo. Otras deben ser ingeridas durante períodos más prolongados, como los “senecios” o el “duraznillo blanco” (*Solanum glaucophyllum* Desf.) (Santos *et al.*, 2008). En este último caso la planta posee un compuesto análogo de la vitamina D₃ (1,25-dihidroxicolecalciferol), que promueve la absorción intestinal de calcio y provoca calcificación metastásica.

I.3.7. Variaciones en la toxicidad

Dentro de una misma especie pueden existir varios factores que condicionan su toxicidad: variedad, época del año, fase del crecimiento, el tipo de suelo, fertilizaciones, el uso de herbicidas, etc. Algunas plantas como *Senecio* spp. o *Sorghum* spp. son más tóxicas durante la fase de crecimiento, otras lo son únicamente durante la floración (*B. coridifolia*), mientras que algunas presentan el efecto tóxico durante el período correspondiente a la fructificación (*A. quitensis*). Incluso dentro de una misma especie puede suceder que distintas variedades pueden ser tóxicas o no, algo que ocurre en *Lantana* spp. Otras, como *Cestrum parqui* o *Echium plantagineum* L. (“flor morada”), presentan grandes variaciones de toxicidad, sin que hayan sido determinadas las causas de tal situación. En el caso de *E. plantagineum*, se trata de una planta muy difundida y palatable en los estadios juveniles, pero que en muy raras ocasiones contiene los principios activos en concentraciones suficientes como para producir casos fatales (Riet-Correa *et al.*, 1993).

I.4. Clasificación de plantas tóxicas para el ganado bovino

En la actualidad las plantas tóxicas se agrupan para su estudio de acuerdo con el órgano o sistema que afectan en mayor medida. En la República Argentina la mayoría de las intoxicaciones son provocadas por las siguientes especies tóxicas:

a) Plantas que afectan al aparato digestivo

- Familia Asteraceae: *Baccharis coridifolia* DC. (“romerillo”, “mio-mio”).
- Familia Solanaceae: *Solanum bonariense* L. (“naranjillo”), *S. eleagnifolium* Cav. (“revienta caballos”), *S. sisymbriifolium* Lam. (“tutiá” o “espina colorada”), *S. pilcomayense*

Morong. (“arachichú negro”), *S. sublobatum* Wild. (“hierba mora”), *S. diflorum* Vell. (“ají del monte”), *S. pseudocapsicum* L. (“tomatillo”).

b) Plantas hepatotóxicas

- Familia Solanaceae: *Cestrum parqui* L’Herit. (“duraznillo negro”).
- Familia Asteraceae: *Pascalía glauca* Ortega (“sunchillo”, “yuyo sapo”), *Xanthium cavaniliensi* Schouw (“abrojo grande”), *Senecio bonariensis* Hook & Arn, *S. madagascariensis* Poir, *S. selloi* Spreng, *S. grisebachii* Baker (“margarita de campo”, “primavera”).
- Familia Scrophulariaceae: *Myoporum laetum* G. Forst (“transparente”).

c) Plantas nefrotóxicas

- Familia Amaranthaceae: *Amaranthus quitensis* H.B.K. (“yuyo colorado”), *A. retroflexus* L. (“amaranto”, “bledo”), *A. blitum* L. (“bledo rojo”), *A. hybridus* L. (“amaranto rojo”), *A. viridis* L. (“amaranto verde”, “bledo verde”).

d) Plantas cianogénicas

- Familia Poaceae: *Sorghum halepense* L. (“sorgo de Alepo”), *S. almum* Parodi (“sorgo negro”), *S. saccharatum* Pers. (“sorgo azucarado”, “sorgo dulce”), *S. sudanense* (Piper) Stapf. (“sorgo sudanense”, “pasto del Sudán”).

e) Plantas que producen calcificación metastásica

- Familia Solanaceae: *Solanum glaucophyllum* Desf. (“duraznillo blanco”, “hediondilla”).

f) Plantas que provocan inhibición de enzimas lisosomales

- Familia Convolvulaceae: *Ipomoea carnea* Jacq. susp. *fistulosa* Choisy (“aguapeí”, “mandiyurá”).

g) Plantas neurotóxicas

- Familia Solanaceae: *Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don., *B. australis* Benth. (“jazmín de América”, “jazmín paraguayo”), *Datura ferox* L. (“chamico”).

h) Plantas que afectan al sistema muscular

- Familia Fabaceae: *Senna occidentalis* (L.) Irwin sin. *Cassia occidentalis* (“cafetillo”).

I.5. Particularidades sobre las intoxicaciones provocadas por plantas hepatotóxicas

En nuestro país existen especies vegetales de probada hepatotoxicidad (Marzocca, 1997; Riet-Correa *et al.*, 1993; Odriozola, 2005; Riet-Correa *et al.*, 2007 Tokarnia *et al.*, 2012). El conocimiento actual en lo que se refiere a estos vegetales demuestra que, dependiendo de la especie que se considere, el consumo por única vez pero en gran cantidad puede causar necrosis hepática (intoxicación de curso agudo), o por el contrario la ingestión en forma prolongada y en poca cantidad diaria puede generar cirrosis hepática (curso crónico) (Barros *et al.*, 1987; Habermehl *et al.*, 1988; Tokarnia *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008).

Dentro de las hepatotóxicas agudas más conocidas en Argentina figuran el “duraznillo negro” (*Cestrum parqui* L’Her., Solanaceae), el “sunchillo” (*Pascalía glauca* Ortega, Asteraceae), el “abrojo grande” (*Xanthium cavaniliensi* Schouw, Asteraceae) y la “transparente” (*Myoporum laetum* G. Forst, Scrophulariaceae) (Tokarnia *et al.*, 1979; Odriozola, 2005). Para el caso de las hepatotóxicas crónicas, varias especies de *Senecio* (*S.*

bonariensis Hook & Arn, *S. madagascariensis* Poir, *S. selloi* Spreng y *S. grisebachii* Baker) también provocan intoxicaciones (Araya y González 1979; Bruneton, 2001).

I.6. Plantas hepatotóxicas agudas

I.6.1. Familia Solanaceae, especie *Cestrum parqui*

I.6.1.1. Características botánicas y distribución geográfica

El “duraznillo negro”, también conocido con los nombres comunes de “palque”, “palqui”, “cestrum verde” o “yellow cestrum”, pertenece a la familia Solanaceae (Figura 11). Es un arbusto perenne que puede alcanzar hasta 2 m de altura. Sus hojas son de color verde claro, brillantes en el envés y verde grisáceas en el revés; simples, enteras, de pecíolo corto y lámina lanceolada, generalmente aguda en el ápice y atenuada en la base, de unos 12 cm de longitud por 1-4 cm de ancho (Liskovsky y Cosa, 2005; Tokarnia *et al.*, 2012). Una característica particular de las hojas es el fuerte olor desagradable que emanan cuando son trituradas, motivo por el cual en ciertas regiones la planta también se conoce como “hediondilla”. Las flores se reúnen en cimas o inflorescencias corimbiformes de color verde amarillento y de forma tubular (Fig. 11), de aproximadamente 2,5 cm de largo; la floración ocurre desde finales de primavera hasta el otoño. El fruto es una baya globosa de 2-4 cm de diámetro, de color negro brillante con cáliz persistente, presente en la planta desde verano a otoño (Fig.12). Su raíz es profunda y resistente (Marzocca, 1997; Liskovsky y Cosa, 2005).



Figura 11. Detalle de flores y hojas de *Cestrum parqui* L'Herit.



Figura 12. Fruto de *Cestrum parqui* L'Herit.

C. parqui es endémico para ciertas regiones de América del Sur. Se halla distribuido en Argentina, Bolivia, Brasil (estados del sur del país), Chile, Paraguay y Uruguay (Riet-Correa *et al.*, 1993; Méndez y Riet-Correa, 2002). En nuestro país se distribuye de norte a sur, llegando hasta la Provincia de Río Negro (Marzocca, 1997). Fuera del continente americano, la planta se encuentra en ciertos países a los cuales ha llegado a través de semillas que contaminan granos que son exportados. En la Fig. 13 puede observarse la distribución en América del Sur y países de otros continentes.



Figura 13. Distribución mundial de *Cestrum parqui* L'Herit. Tomado del sitio en Internet “Plants of the World online”, disponible en <http://plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30046363-2>

I.6.1.2. Principios activos presentes en la planta

Posee glicósidos denominados parquina (Fig. 14) y carboxiparquina (Pearce, 1992; Oelrichs *et al.*, 1994; Bruneton, 2001) que se diferencian en el carbono 4 en un grupo carboxilo, y las saponinas gitogenina y digitogenina (Canham y Warren, 1950). También son considerados químicamente como carboxiatractilósidos. Estos compuestos producen un cuadro de intoxicación de curso agudo de 4 a 36 h de evolución.

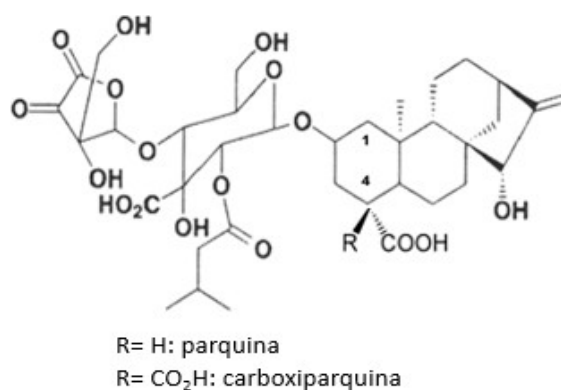


Figura 14. Estructura química de parquima y carboxiparquima (Tomado y modificado de Bruneton, 2001).

A pesar de la comprobada toxicidad de esta planta, en algunos países su uso está relacionado a la etnobotánica. En Chile, por ejemplo, en algunas regiones del sur del país las personas lo utilizan para tratar procesos inflamatorios (Cortés Cortés, 2019). También se menciona este uso en Bolivia (Motalgo Vargas, 2006), incluso en nuestro país (Scarpa y Anconatini, 2017). En la mayoría de los casos se hace referencia al uso como decocciones o infusiones tibias para el lavado de heridas infectadas.

I.6.1.3. Signos asociados a la intoxicación

Los signos clínicos en los animales intoxicados, generalmente bovinos (Descazeaus, 1930; Rudd, 1933; López *et al.*, 1978) se caracterizan por alteración de la conducta (agresividad o depresión), anorexia, paresia del tren posterior, incoordinación, temores musculares, atonía y dolor ruminal, heces secas con presencia de moco y estrías de sangre, y en ocasiones dificultad para defecar y gemidos (McLennan y Kelly, 1984; Riet-Correa *et al.*, 1993). El animal puede permanecer inmóvil con la cabeza apoyada sobre objetos cercanos. A la necropsia la superficie del hígado se presenta con aspecto de “nuez moscada” (reticulado tóxico); existe edema en varios órganos del aparato digestivo y presencia de heces duras en el

interior de los intestinos (Tokarnia *et al.*, 2002). La alteración histológica más importante es la necrosis coagulativa que afecta las regiones centrolobulillares, periportal e intermedia del hígado (Méndez y Riet-Correa, 2002). No existe tratamiento para la intoxicación, pero se puede prevenir eliminando la maleza mediante la aplicación de herbicidas.

I.6.2. Familia Asteraceae, especie *Pascalía glauca*

I.6.2.1. Características botánicas y distribución geográfica

El “yuyo sapo”, “sunchillo”, “clavel amarillo” o “flor del sapo” es una planta herbácea de 0,30-1 m de altura, rizomatosa, que forma colonias invasoras (Rodríguez Armesto *et al.*, 2003). Sus hojas son opuestas, simples, lanceoladas, trinervadas, enteras o paucidentadas, pubescentes, de 0,6-1,5 cm de largo, como característica suelen presentar dos o tres “dientes” en la base (Fig. 15). Sus flores poseen capítulos globosos, ligulados, amarillos, largamente pedunculados, terminales (Fig. 16). Se propaga por semillas y rizomas, iniciando su crecimiento vegetativo a finales de invierno para florecer en primavera y fructificar en otoño.



Figura 15. Detalle de las nervaduras (flechas blancas) y de los “dientes” (flechas amarillas) en la base de una hoja de *Pascalía glauca* Ortega.



Figura 16. Detalle de la flor de *Pascalia glauca* Ortega.

Crece en casi todas las Provincias de Argentina, desde Chaco hasta el sur de La Pampa y Buenos Aires (Marzocca, 1997; Fernández Pazos, 2010). Como se ha mencionado para el caso de *C. parqui*, existe en ciertos países fuera del continente americano, en los cuales es posible encontrarla como maleza invasora (Fig. 17).



Figura 17. Distribución mundial de *Pascalia glauca* Ortega. Tomado del sitio en Internet “Plants of the World online”, disponible en <http://plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30046363-2>

I.6.2.2. Principios activos presentes en la planta

Pascalía glauca se caracteriza por su fuerte aroma debido a los aceites esenciales que contiene, de los cuales existen algunos estudios. Bailac *et al.* (2005) establecieron que es rico en limoneno, sabineno y α -pineno. Otros autores ensayaron el efecto repelente y acaricida de los aceites esenciales de *P. glauca* (Rufinengo *et al.*, 2005). Si bien se clasifica como tóxica, se menciona que por la presencia de los aceites esenciales podría tener propiedades como planta medicinal y aromática (Del Vitto y Petenatti, 2015).

El compuesto tóxico del “sunchillo” es un glicósido diterpénico denominado atractilósido (Fig. 18), un agente inhibidor específico y muy potente del carrier mitocondrial ADP/ATP, pudiendo inducir un efecto de desacople en la organela (Santi, 1958; Vignais *et al.*, 1962; Allman *et al.*, 1967; Alberts *et al.*, 2016).

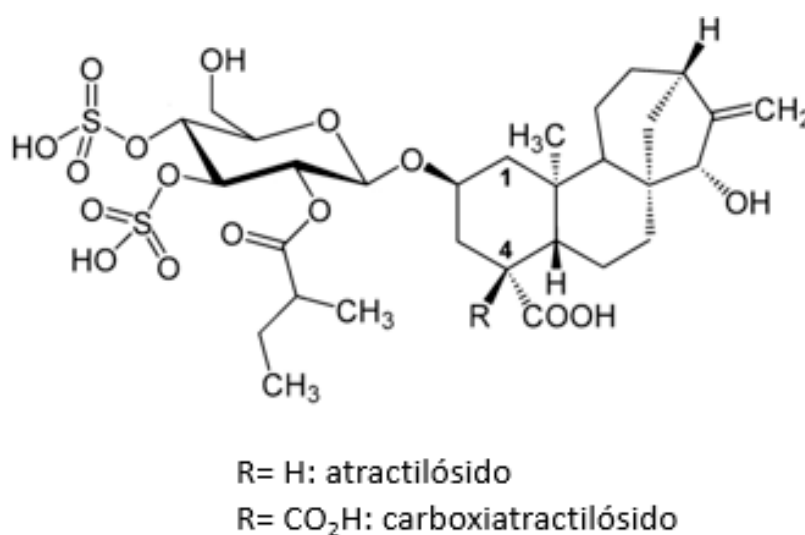


Figura 18. Estructura general de un atractilósido (Tomado y modificado de Bruneton 2001).

I.6.2.3. Signos asociados a la intoxicación

La intoxicación se ha demostrado en bovinos, ovinos y porcinos, siendo en la primera especie en la que se diagnostica con mayor frecuencia. Como en la gran mayoría de las intoxicaciones de origen vegetal, esta sucede de forma accidental cuando existe falta de alimentos, ya que esta especie posee mal sabor y olor que desalientan el consumo. Los signos no son muy orientativos, siendo principalmente de tipo neurológicos a consecuencia de encefalopatía hepática (Collazo y Riet-Correa, 1996). A la necropsia, la lesión más característica es la necrosis centrolobulillar que da al hígado aspecto en “nuez moscada”. La vesícula biliar se encuentra pletórica, hiperémica y con hemorragias petequiales en su mucosa, con edema en submucosa (Alonso y Cargnel, 2007). También es posible hallar sangre en el duodeno (Santos *et al.*, 2008) (Fig. 19). Microscópicamente se observan signos de necrosis coagulativa hemorrágica, caracterizados por picnosis, cariorexis, cariólisis y hemorragia (Fig. 20). No existe tratamiento efectivo para los animales intoxicados.



Figura 19. Intoxicación por ingestión de *Pascalia glauca* Ortega en bovino. La presencia de sangre en la primera porción del intestino delgado es un hallazgo frecuente en las intoxicaciones por hepatotóxicos agudos, también se puede observar en la intoxicación por *C. parqui* (Fotografía gentileza Méd. Vet.

Enrique Costa).

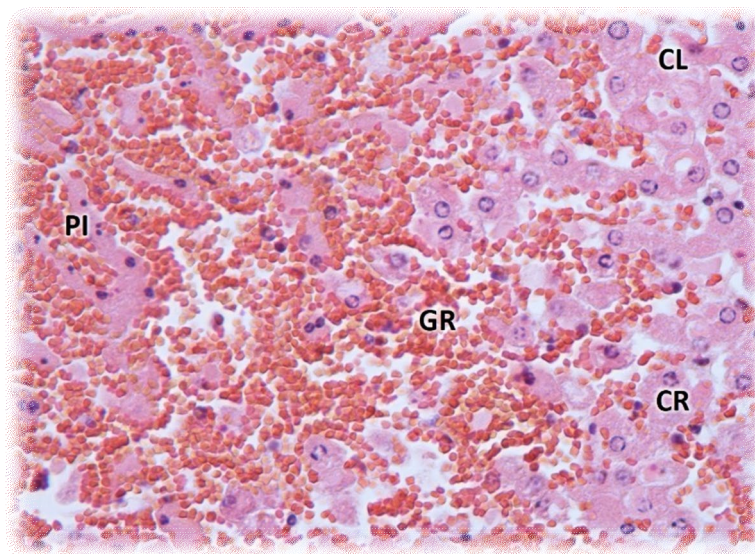


Figura 20. Intoxicación natural por ingestión de *Pascalía glauca* Ortega en bovino. Necrosis coagulativa hemorrágica caracterizada por picnosis (PI), cariorrhexis (CR) y cariolisis (CL), con abundantes glóbulos rojos (GR) (Fotografía gentileza Méd. Vet. Enrique Costa).

I.7. Mecanismo de acción tóxica de los atractilósidos presentes en *C. parqui* y *P. glauca*

Fisiológicamente, la síntesis de ATP ocurre gracias a la acción del carrier ADP/ATP (CAA), entre otros componentes que participan del proceso de la fosforilación oxidativa. El CAA es un miembro de la familia de transportadores mitocondriales que transporta solutos entre el citoplasma y la membrana mitocondrial, algunos tan pequeños como OH^- y H^+ , o más grandes como ADP y ATP a partir del transportador TIM 22 (translocador de la membrana mitocondrial interna) (de Juan Herrero *et al.*,2022). Varios autores han explicado la hipótesis acerca de la estructura química y funcionamiento del CAA, que expresan lo complejo del mecanismo. De manera resumida, el CAA tiene la capacidad de adoptar estados de transición que permiten la unión de un soluto, su pasaje a través de un canal, y su liberación hacia el otro lado (ya sea citoplasma o membrana mitocondrial interna) (Klingenberg, 1992) (Fig. 21).

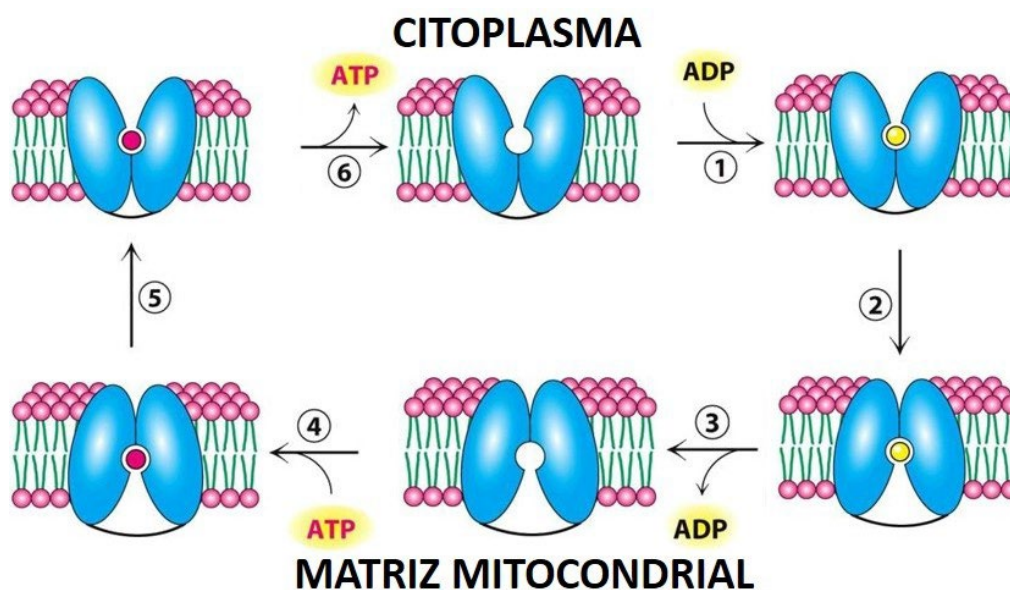


Figura 21. Representación esquemática del mecanismo de transporte de solutos por el carrier ADP/ATP entre el citoplasma y la matriz mitocondrial. Números 1-6 indican orden de la secuencia.

Desde el punto de vista toxicológico, el atractilósido se combina con la transposasa de adenina dinucleótido (enzima presente en el CAA), inhibiendo así el transporte de ADP a través de la membrana mitocondrial, impidiendo la síntesis de ATP, conduciendo por lo tanto a un desbalance energético. El detrimento en los niveles de ATP resulta crítico para cualquier proceso oxidativo a nivel celular, generándose acumulación de especies reactivas del oxígeno, situación que usualmente precede los estadios irreversibles de la injuria celular (Luciani *et al.*, 1971; Obatomi *et al.*, 1998).

I.8. Radicales libres y peroxidación de membranas

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas con un electrón desapareado en el orbital más externo. Son producidos constantemente durante el curso de muchas reacciones esenciales para la vida aeróbica, como por ejemplo en las de transferencia electrónica en la cadena respiratoria mitocondrial y también en ciertas reacciones citoplasmáticas (Slater, 1972;

Freeman y Crapo 1982; Simic *et al.*, 1988). Durante la respiración celular se produce la reducción univalente del oxígeno (Fridovich, 1975) y por lo tanto la mayoría de los radicales libres formados en condiciones fisiológicas son diferentes formas de radicales del oxígeno: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales hidroxilos (OH^{\cdot}) y oxígeno singulete (O_2), conocidos también como especies reactivas del oxígeno (ROS) (Sies, 1991; Halliwell *et al.*, 1992). El estado redox de la célula está muy relacionado con el hierro. A pH fisiológico el mayor porcentaje de hierro se encuentra oxidado y unido a sus quelantes biológicos en forma de Fe^{+3} . Para participar en la reacción de Fenton, donde el peróxido de hidrógeno reacciona con el Fe^{+2} , el hierro tiene que ser reducido. Sin embargo, *in vivo* y bajo condiciones de estrés celular, un exceso de anión superóxido libera hierro de sus moléculas quelantes, desencadenando dicha reacción (Fenton, 1894). Al ser sustancias muy inestables poseen gran reactividad y su vida media suele ser en el rango de los milisegundos (Simic *et al.*, 1988)

El balance entre la generación de radicales libres y su neutralización es controlado por mecanismos complejos entre los que se incluyen: a) compartimentalización entre los sitios de producción de ROS (mitocondrias y fracciones del retículo endoplásmico) y las biomoléculas vulnerables a ellos, b) mecanismos enzimáticos de atrapamiento de ROS: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y c) presencia de sustancias con propiedades antioxidantes: vitamina E, vitamina C, selenio y glutatión. Si los mecanismos protectores están alterados y la velocidad de generación de ROS excede a la capacidad antioxidante, las reacciones producidas por estas moléculas pueden tener gran significancia fisiopatológica. El daño oxidativo ocurre sobre diferentes macromoléculas celulares: proteínas y ácidos nucleicos (Wolff y Dean, 1986; Bramvilla *et al.*, 1989; Halliwell, 1996; Devasagayam *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2006). Sin embargo, el efecto más estudiado del ataque por ROS es el causado sobre las moléculas lipídicas que conduce a la lipoperoxidación (oxidación de los enlaces metilénicos

de los ácidos grasos no saturados) que resulta en la formación de lipoperóxidos e hidroperóxidos, que finalmente conducen a la fragmentación de la molécula lipídica.

Los ácidos grasos polinosaturados (PUFA) unidos a fosfolípidos de membrana son fácilmente oxidados, y sus productos de oxidación son radicales lipídicos inestables (peróxidos y aldehídos) altamente tóxicos, los que son responsables de la cadena de propagación sobre otros ácidos grasos (Di Pierro *et al.*, 1997). La producción en exceso de ROS, particularmente radicales hidroxilos, puede alterar los lípidos de las membranas con la producción subsecuente de peróxidos lipídicos. Los radicales libres se pueden formar a partir de diversos mecanismos, siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común de ellos. Una vez que estos son formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable, razón por la cual interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido-reducción (redox). En dichas circunstancias, hay una transferencia de electrones que necesariamente implica la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes. Dicho mecanismo genera la producción en cadena de ROS, ya que al reaccionar un radical libre con una molécula no radical, inevitablemente esta última pasa a ser un radical libre. Dicha reacción en cadena solamente se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí. La peroxidación lipídica no-enzimática es una reacción en cadena mediada por radicales libres en la que un radical puede inducir la oxidación de un gran número de moléculas lipídicas (LH), principalmente fosfolípidos conteniendo PUFA (Slater, 1984).

En el organismo los radicales libres se encuentran involucrados en numerosas enfermedades e injurias tisulares como las que ocurren a nivel pulmonar (Park, 2009), cardíaco (Dhalla *et al.*, 2000), gastrointestinal (Lykkesfeldt y Svendsen 2007; Bhattacharyy *et al.*, 2014), sanguíneo (Sinha *et al.*, 2003), ocular (Katz *et al.*, 1982), nervioso (Ghandi y

Abramov, 2012) y neoplásico (Kensler y Trush, 1989), como también los asociados a procesos de envejecimiento. Dentro de los lípidos, los PUFA son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres (Cheeseman y Slater, 1993). La lipoperoxidación inducida por ROS es un fenómeno que ocurre en diferentes condiciones patológicas tales como isquemia y reperfusión de tejidos, inflamaciones crónicas, toxicidad a ciertas drogas naturales y artificiales (Dalle-Donne *et al.*, 2004).

Los procesos de peroxidación lipídica involucran a las etapas de iniciación, propagación y terminación (Haliwell y Chirico, 1993; Pryor, 1976; Buege y Aust, 1978) (Fig. 22). El paso de iniciación resulta del ataque del radical libre sobre grupos metilénicos entre o adyacentes a las bandas etilénicas de los PUFA, y es seguido por una reacción en cadena (paso de propagación) que produce varios tipos de radicales libres secundarios tales como L^\bullet (radicales lipídicos primarios), LO^\bullet (radicales alcoxi) y LOO^\bullet (radicales hidroperóxido) y otros productos intermediarios.

La iniciación es generalmente realizada por un radical (R^\bullet) que posee suficiente reactividad:



El oxígeno molecular se adiciona rápidamente al radical lipídico carbono-central (L^\bullet) formado en este proceso, generando un radical peroxilo lipídico (LOO^\bullet):



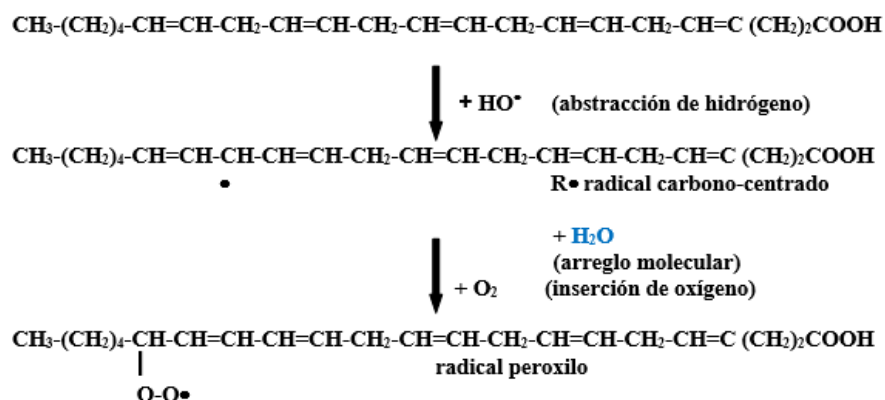
Este puede a su vez sustraer un átomo de hidrógeno desde otro PUFA en forma similar a la ecuación (a):



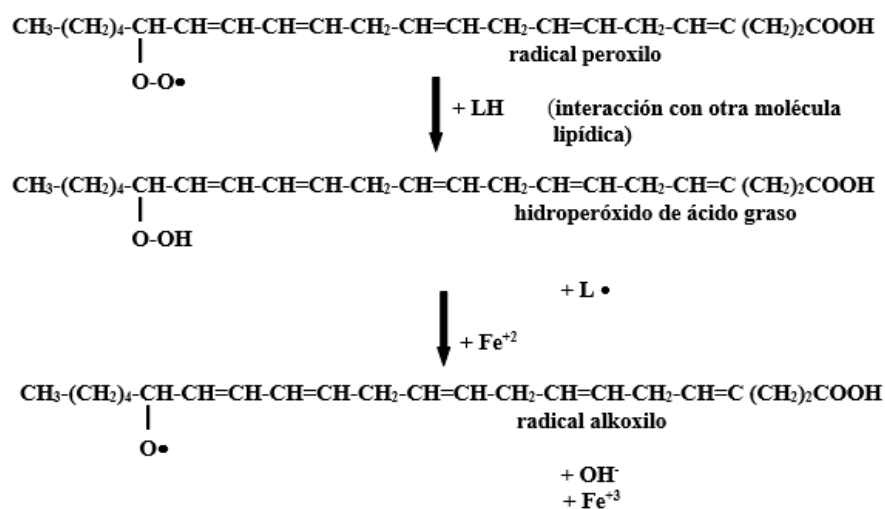
La reacción (c) se denomina propagación, indicando que un golpe de iniciación puede causar la conversión de varias moléculas PUFA a hidroperóxidos lipídicos, donde varios de

los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares (Comporti, 1993), causando mutaciones en el ADN, y produciendo daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994).

Iniciación



Propagación



Terminación

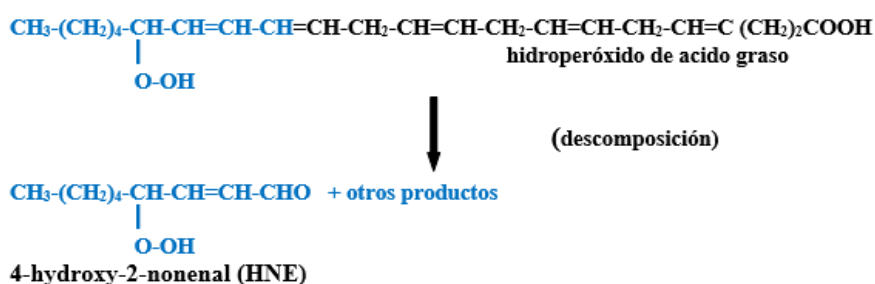
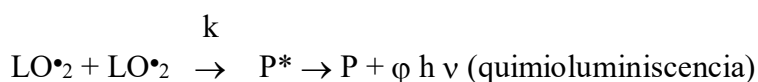


Figura 22. Representación esquemática de la peroxidación del ácido docosapentaenoico (22:5 n-6), inducida por radicales hidroxilos (tomado y modificado de Vaca *et al.*, 1988).

La quimioluminiscencia es la emisión lumínica derivada de una reacción química tal como la reacción de terminación de la peroxidación lipídica, en la cual moléculas químicamente excitadas decaen hasta niveles electrónicos basales y emiten fotones (Dodeigne, *et al.*, 2000). La medida de la emisión lumínica a partir de una reacción química es muy útil desde el punto de vista analítico debido a que, bajo condiciones experimentales apropiadas, la intensidad de la luz está directamente relacionada con la concentración de ácidos grasos, constituyendo por lo tanto un método cuantitativo preciso y sensible para determinar daño oxidativo. Se conocen tres reacciones que provocan la ruptura de las cadenas de los PUFA, a saber:

- a) Interacción de dos radicales
- b) Interacción de un radical con un metal
- c) Reacción entre un radical y una molécula de “antioxidante”

En el caso particular de a), se explica a través de la siguiente reacción:



Esta reacción es acompañada con quimioluminiscencia cuya intensidad (I) puede servir como una medida de la concentración del radical libre peróxido ($\text{LO}\cdot_2$), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I = K \varphi k [\text{LO}\cdot_2]^2$$

Donde φ representa el quantum de quimioluminiscencia y K es un coeficiente dependiente de la sensibilidad neta del instrumento, $\text{LO}\cdot_2$ es un radical libre producido a partir de moléculas lipídicas, P^* representa a un producto altamente energético, P representa a un producto estable, h representa a la constante de Planck y ν representa al coeficiente de la luz (Vladimirov *et al.*, 1980).

I.9. Compuestos de las plantas capaces de promover la peroxidación de membranas a través de la formación de radicales libres

Como se ha mencionado, las plantas sintetizan diferentes sustancias químicas en defensa contra bacterias, hongos, insectos y otros depredadores, incluyendo herbívoros. Algunos principios tóxicos presentes en vegetales pueden comportarse como promotores de radicales libres, o bien en otros casos pueden actuar inhibiendo los sistemas antioxidantes (Bruneton, 2001).

Los carboxiatractilósidos parquina, hidroxiparquina y otros atractilósidos, presentes en las plantas hepatotóxicas estudiadas en esta tesis, son potentes inhibidores de la respiración mitocondrial y de la síntesis de ATP (Lemaster y Sowers, 1979). Este proceso ocurre a nivel del CAA a través de la membrana de esta organela, alterando la fosforilación oxidativa mediante un bloqueo en la translocación de adenina dinucleótido (ADP) (Klingerberg *et al.*, 1985; Obatomi *et al.*, 1988). Estudios recientes *in vitro* han demostrado que los atractilósidos inhiben la formación de ATP en las mitocondrias hasta en un 30%, lo que a su vez promueve el estrés oxidativo generado por ROS, provocando una disminución en la capacidad fagocítica de células del epitelio pigmentario retinal (Schütt *et al.*, 2012). Los atractilósidos en particular han demostrado poseer capacidad para alterar funciones anabólicas y catabólicas *in vivo* (Georgiou *et al.*, 1998), y en humanos el consumo de algunas variedades de granos de café tostados (que poseen estos compuestos) se ha relacionado con cáncer de páncreas (Pegel, 1981).

A pesar de los datos significativos sobre muertes en seres humanos y animales provocadas por estas sustancias (Bhoola, 1983; Hutchings y Terblanche, 1989), en Medicina Veterinaria existen escasos estudios fitoquímicos o etiopatogénicos sobre el mecanismo de

daño que producen estos compuestos, y por lo tanto no se han establecido normas seguras para limitar o prevenir la toxicidad de estas plantas. Es interesante tener presente que *C. parqui* y *P. glauca*, además de estar clasificadas como plantas tóxicas, son utilizadas como medicinales en ciertas regiones de América Latina. En estos casos, como en la mayoría de las situaciones en las que intervienen sustancias tóxicas, el efecto dependerá de la concentración de principios activos y de la vía de ingreso al organismo.

I.10. Estudios sobre genotoxicidad de plantas tóxicas

Los estudios que se llevan a cabo para evaluar la posible acción genotóxica de los compuestos ambientales son de vital importancia en la prevención de la mutagenicidad y carcinogenicidad en el hombre (Mosesso y Palitti, 1993). Los métodos empleados con dicho fin requieren ser altamente sensibles para detectar el daño genético y ser capaces de medir diferentes tipos de eventos genéticos. De la línea celular CHO, obtenida a partir de un explante de tejido de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) obtenida en 1973 por Puck y colaboradores, existen múltiples variantes mutacionales, lo cual amplía las posibilidades de su uso en estudios genéticos de células eucariotas. La línea celular de cultivo permanente CHO cumple todos esos requisitos, por lo que constituye uno de los materiales biológicos de experimentación más importantes en genotoxicidad. Constituye un material biológico de experimentación de fácil manejo, posee propiedades que lo hacen idóneo para estudios de daño genético a nivel cromosómico y de gen. Por otra parte, es versátil por el número y tipo de ensayos diferentes que se pueden realizar para evaluar genotoxicidad de diversos compuestos (Graberhorst *et al.*, 1999; Condon *et al.*, 2003).

Los efectos genotóxicos de algunas plantas tóxicas han sido evaluados para ciertas especies. Se ha demostrado que *Senecio* spp. posee dicha capacidad, y que esto es debido a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos (Fu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2020). Otros compuestos,

como el ptaquilósido presente en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (“helecho hembra”, “bracken fern”, Dennstaedtiaceae) también provoca esta alteración (Gomes *et al.*, 2012; Tourchi, 2014). En el caso de *Cestrum parqui* y *Pascalía glauca*, no existen estudios de este tipo, salvo algunos relacionados con ciertas asteráceas también hepatotóxicas, como por ejemplo *Xanthium spinosum* L. (“abrojo chico”), del cual se ha demostrado la ausencia de efectos genotóxicos (Martins Gúez *et al.*, 2012).

I.11. Hipótesis

Se plantean las siguientes:

- Algunos compuestos químicos presentes en *Cestrum parqui* y *Pascalía glauca* se comportan como prooxidantes de membranas celulares, provocando la peroxidación de membranas de microsomas y mitocondrias hepáticas, aumentando el estrés oxidativo de membranas biológicas en sistemas *in vitro*.
- Ciertos principios químicos de ambas plantas se comportan como agentes genotóxicos en células CHO.

I.12. Objetivos

- Estudiar los efectos que provocan los extractos de *C. parqui* y *P. glauca* en microsomas y mitocondrias de hepatocitos de ratas Wistar para determinar el rol que poseen ciertos principios químicos sobre el estrés oxidativo de membranas biológicas y relacionar los posibles resultados con el daño hepático característico producido por ambas plantas. Además, analizar los efectos que ocasionan los extractos de *C. parqui* y *P. glauca* en células CHO para evaluar y describir el papel que desempeñan.

CAPÍTULO II

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Material vegetal

Las plantas fueron recolectadas en La Plata y zonas aledañas durante los meses de noviembre a enero durante los años 2017 y 2018. La determinación botánica se realizó con la colaboración del Prof. Dr. Néstor Bayón del Área Botánica perteneciente al Departamento de Biología y Ecología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, y por el Director de esta tesis. Los especímenes de referencia fueron catalogados y reservados en el Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

II.1.1. Material estudiado

Cestrum parqui L'Herit.

Zeinsteger, 011, Berisso, Provincia de Buenos Aires, 11.2017; Barberón, 012, La Plata, Provincia de Buenos Aires, 11.2017; Zeinsteger, 013, Magdalena, Provincia de Buenos Aires, 11.2017.

Pascalía glauca Ortega.

Zeinsteger, 021, Magdalena, Provincia de Buenos Aires, 11.2017; Cerrutti, 022, Brandsen, Provincia de Buenos Aires, 12.2017. Barberón, 028, Berisso, Provincia de Buenos Aires, 01.2018.

II.2. Obtención de los extractos

Se utilizaron hojas de las plantas seleccionadas en estado vegetativo, las que fueron lavadas con abundante agua corriente, secadas al aire a temperatura ambiente y posteriormente molidas.

Para la preparación de los extractos se utilizó la marcha fitoquímica según técnica descrita por Lock De Ugaz, 2001. Se utilizó 1 g de material vegetal molido al que se adicionaron 50 ml de metanol para su maceración durante 24 h sobre agitador magnético a temperatura ambiente, en un ambiente con luz reducida.

El extracto metanólico así obtenido fue desecado utilizando un rotaevaporador marca Senco R206 y el residuo obtenido se resuspendió con 50 ml de metanol. Sobre este último extracto se utilizaron solventes orgánicos de serie eluotrópica a fin de separar las fracciones inorgánicas y orgánicas, y obtener aquellas que fueron utilizadas para los estudios fitoquímicos. En el siguiente esquema (Fig. 23) se indican los pasos que fueron realizados hasta la obtención de las diferentes fracciones:

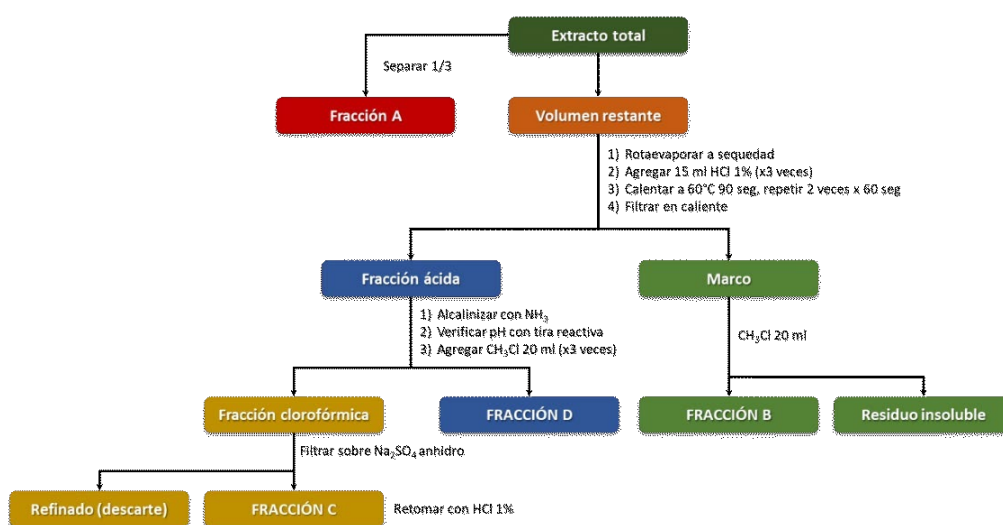


Figura 23. Esquema de marcha fitoquímica (Tomado y modificado de Lock De Ugaz, 2001).

II.3. Análisis fitoquímico

Cada fracción (A, B, C) fue sometida a una serie de ensayos químicos con el objeto de determinar la presencia o ausencia de diferentes metabolitos a través de reacciones químicas cualitativas (Lock de Ugaz, 2001).

II.3.1. Fracción A

II.3.1.1. Flavonoides

Reacción de Shinoda: A 0,5 ml de fracción A se le agregó una granalla de Zn, luego se adicionaron 0,2 ml de HCl concentrado. Se aguardó hasta la disolución total de la granalla (transcurrieron 12 h). Posteriormente se agregaron 0,2 ml de alcohol amílico y luego 2 ml de agua destilada. El Zn es oxidado por acción del HCl concentrado, lo que produce H_2 y $ZnCl_2$, que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. Se considera como reacción positiva para la presencia de flavonoides la aparición de una tonalidad rosa tenue a guinda en la fase orgánica (dependiendo de la concentración en la muestra).

II.3.1.2. Taninos y OH fenólicos

Reacción de cloruro férrico: Se colocaron 3 ml de fracción A en un tubo de ensayo y se evaporó a sequedad mediante Baño María. El residuo seco se disolvió en 1 ml de agua destilada y se agregaron 3 gotas de $FeCl_3$ al 1% acuoso. El ion cloruro se une al hidrógeno de grupos hidroxilo y provoca una ruptura de enlace, y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo). La aparición de color varía de acuerdo con la cantidad y posición de los oxhidrilos fenólicos presentes: amarillo indica la presencia de un -OH adyacente, verde grisáceo dos -OH, y azul negruzco tres -OH.

Reacción con gelatina: Se evaporaron a sequedad 3 ml de fracción A calentando a Baño María. El residuo seco se disolvió en 1 ml de agua destilada y se agregaron 10 gotas de una solución acuosa de gelatina al 2% (preparada con agua tibia). La aparición de turbidez hasta un precipitado abundante indica la presencia de taninos, ya que las proteínas al reaccionar con los taninos generan turbidez por desnaturalización.

II.3.1.3. Lípidos

Se utilizó la técnica de vapores de yodo sublimado. Para la obtención de yodo sublimado se utilizaron cristales de yodo colocados en vaso de precipitado, al cual en su abertura se colocó un vidrio de reloj con hielo. El equipo así formado se colocó sobre platina térmica hasta emisión de vapores; la baja temperatura del vidrio de reloj favorece la cristalización del yodo, que rápidamente se colocó en un recipiente de vidrio con tapa a rosca.

Para la determinación de lípidos en el extracto se sembraron algunas gotas de fracción A sobre papel de filtro y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente. Luego el papel de filtro se expuso a los vapores del yodo sublimado. La aparición de una mancha de color marrón-naranja indica la presencia de compuestos lipídicos.

II.3.1.4. Glúcidos

Reacción con fenol 5% + H₂SO₄ concentrado: Se evaporaron hasta sequedad mediante Baño María 2 ml de la fracción A. Al residuo seco se le adicionaron 2 ml de agua destilada y 0,5 ml de solución acuosa de fenol al 5%. El tubo de ensayo se inclinó 45° y se agregaron lentamente 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado. La formación de un anillo de color pardo-naranja indica la presencia de azúcares.

II.3.2. Fracción B

II.3.2.1. Esteroides y triterpenos

Reacción de Liebermann-Burchard: En un tubo de ensayo se mezclaron 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo. Esta solución se enfrió en un baño de hielo. A continuación, 2 ml de la fracción B se pusieron en contacto con la mezcla anterior de reactivos, y el tubo de ensayo se colocó nuevamente sobre hielo. Posteriormente se agregaron 0,2 ml de H₂SO₄ concentrado en medio anhidro (previamente enfriado). Se enfrió el tubo con la totalidad de los reactivos. La aparición de una tonalidad verdeazulada indica la presencia de grupo esteroide; la coloración rojo-naranja evidencia un grupo triterpénico.

II.3.2.2. Antraquinonas

Reacción de Bornträger: Se agitaron 3 ml de la Fracción B con 5 ml de NaOH al 5%. La aparición en la fase alcalina acuosa de una coloración rojiza o amarilla con fluorescencia roja indica la presencia de antraquinonas.

II.3.3. Fracción C

II.3.3.1. Alcaloides

Reactivo de Dragendorff: Para la preparación del reactivo se disolvieron 8 g de subnitrito de bismuto en 20 ml de HNO₃ de densidad 1,8 g/ml (20 ml de HNO₃ en 50 ml de agua destilada); dicha solución se traspasó a un vaso de precipitados que contenía una solución preparada con 22,7 g de KI en 20 ml de agua; se dejó reposar por aproximadamente una hora y luego se separó el KNO₃ decantado, y se llevó a volumen final 100 ml con agua destilada.

Para la reacción química, 0,2 ml de la Fracción C se llevaron a sequedad utilizando Baño María, luego se agregaron 2 ml de HCl 1% y 2 gotas del reactivo de. La aparición de un precipitado color pardo-anaranjado indica la presencia de alcaloides.

II.3.3.2. Cardenólidos

Reacción de Legal: A 2 ml de la fracción se agregaron 2-3 gotas de piridina y 1 gota de una solución de nitroprusiato de sodio al 0,5%; a continuación se añadieron, gota a gota, 4 gotas de KOH 2 N. La aparición de un color rojo claro a oscuro indica la presencia de lactonas.

II.3.3.3. Leucoantocianinas

Reacción de Rosenheim: Se evaporaron a sequedad 2 ml de fracción C y el residuo se retomó con 2 ml de HCl al 1% en agua destilada. A la solución así formada se agregó 1 ml de HCl concentrado, se mezcló con cuidado y se calentó en Baño de María durante 10 min. Se aguardó a que la temperatura se igualara a la del ambiente del laboratorio, y se agregaron 0,1 ml de alcohol amílico y se agitó suavemente. La aparición de coloración desde carmesí hasta rosa pálido en la fase amílica indica la presencia de leucoantocianinas.

II.3.4. Reacciones directas

Para el estudio de saponinas el material vegetal recolectado, se lavó para retirar las partículas de tierra y se fraccionó. Dentro de las 24 h se determinaron las saponinas. Para ello se pesaron 0,5 g de planta, se molió la muestra y se agregó 8 ml de agua destilada. El producto triturado se hirvió a Baño María durante 10 min. Luego se filtró en caliente y se tomó una alícuota de 1 ml en un tubo. Se colocó un tapón de goma y se agitó fuertemente por 15 s, tras los cuales se midió la altura de la espuma producida a los 5 y 15 min. Para evaluar

cualitativamente el contenido de saponinas se utilizó la escala de Harborne (1989) que establece, de acuerdo con la altura de la columna de espuma formada, lo siguiente:

- Menor a 1 cm: prueba ligeramente positiva.
- Igual a 2 cm: prueba positiva.
- Mayor a 2 cm: prueba fuertemente positiva.

II.4. Ensayos de peroxidación de membranas biológicas

II.4.1. Animales de laboratorio

Los microsomas y mitocondrias hepáticas se obtuvieron a partir de Ratas Wistar AH/HOK (machos de ocho semanas de vida, n=8). Todas las operaciones que implicaron el manejo de animales de laboratorio y la eutanasia fueron supervisados por el CICUAL (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Expediente 600-009500/12-000, Res. 38.

II.4.2. Determinación de proteínas

En las muestras de microsomas y mitocondrias el contenido de proteínas fue determinado por el método de Lowry O.H. *et al.*, 1951 y Schacterle, Pollack, 1973. Este método tiene la ventaja de detectar μg de proteína presentes en microsomas y mitocondrias. Se utiliza albúmina sérica bovina (BSA), cuya concentración de proteína es conocida (1 mg/ml).

Las reacciones que ocurren en el método de Lowry son las siguientes:

La primera reacción se realiza incubando la solución de proteínas con el reactivo de Lowry (se prepara mezclando los reactivos A, B₁ y B₂ en proporción 50:0,5:0,5 V/V/V), el cual a su vez se encuentra constituido por el reactivo alcalino de cobre (ACR), el cual contiene el reactivo A (Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 M), el reactivo B₁ (CuSO₄ 1%) y el reactivo B₂ (tartrato sódico-potásico al 2%). El Cu actúa como catalizador y está suspendido con el tartrato doble de sodio y potasio para evitar su precipitación en un medio alcalino (NaOH). Se forma un complejo entre el cobre y el nitrógeno proteico.

Luego los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico dando lugar a una coloración azul, este reactivo (de color amarillo) contiene ácido fosfomolibdotúngstico, que se reduce por medio de los grupos fenol (y en menor medida imidazol e indol) presentes en la proteína a un complejo de color azul claro, que se mide colorimétricamente. El aumento en el color ocurre cuando el complejo de cobre transfiere los electrones al complejo fosfomolibdato/fosfotungstato, y la reacción que produce una coloración azul se lee a 650 nm. Esta reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu ocurre solamente con los residuos de tirosina y triptófano de la proteína.

Procedimiento

Se coloca el H₂O_d, BSA y el reactivo alcalino de cobre (volumen final 1000 µl), se agita con vortex durante 5 s, luego se deja 10 min. a temperatura ambiente y se agregan 1000 µl del reactivo de Folin 5,8 %. Se agita nuevamente con vortex por 5 s, se lleva 5 min. a Baño María a 55 °C. Se deja 10 min. a temperatura ambiente y se procede con la lectura en espectrofotómetro Shimadzu UV 160 U (Tokio, Japón), a 650 nm de longitud de onda, llevando a autocero con el tubo blanco.

II.4.3. Obtención de homogenatos y mitocondrias

Se obtuvieron homogenatos mediante centrifugación diferencial de los hígados extraídos de los animales (Völkl, 2010) que fueron sacrificados por dislocación cervical. Los órganos fueron cortados con tijera en pequeños trozos y se procesaron iniciando con un lavado con solución 0,15 M de NaCl. Luego, con el uso del homogeneizador mecánico tipo Potter-Elvehjem, se homogenizaron en solución A (sacarosa 0,25 M, buffer Tris-HCl 0,01 M pH 7,4, fluoruro de fenilmetilsulfonilo -PMFS- 0,01 M), utilizando 1 g de tejido en 3 ml de solución, operado mecánicamente (tres golpes de émbolo). El homogeneizado así obtenido se centrifugó a 3000 rpm x 5 min, los pellets se descartaron, y se centrifugó el sobrenadante nuevamente a 13500 rpm durante 10 min. De esta forma se obtuvieron los sobrenadantes postmitocondriales y las mitocondrias que fueron resuspendidas en 3 volúmenes de la solución compuesta por 0,25 M de sacarosa, 0,01 M Tris HCl pH 7,4; 0,1 mM PMSF (Schneider *et al.*, 1953; Boveris *et al.*, 1999) de cada uno de los homogeneizados. Todas las operaciones fueron realizadas a 4 °C.

II.4.4. Obtención de microsomas

Los microsomas son fracciones del retículo endoplásmico (Becker *et al.*, 2007; De Robertis y Hib, 2012; Plattner y Hentschel, 2014) obtenidas por la ultracentrifugación de los tejidos. Se aplicó el sobrenadante postmitocondrial a columnas de Sepharosa 4B (buffer de elusión Tris HCl 0,01 M, pH 7,4) para separar material particulado (microsomas) de la fracción soluble (citosol) según Tangen *et al.*, 1973. La suspensión de microsomas fue estabilizada con el agregado de sacarosa sólida a razón de una concentración 0,25 M.

II.4.5. Ensayo de peroxidación de microsomas y mitocondrias

La peroxidación no enzimática de las membranas en estudio se realizó mediante un sistema *in vitro*, dependiente de ácido ascórbico-Fe⁺² (0,4 mM) en buffer 0,05 M fosfato pH 7,4, a 37°C y H₂O₂ utilizando 1 mg y 0,5 mg de proteína para microsomas y mitocondrias, respectivamente (Vladimirov *et al.*, 1980). El buffer fosfato contiene el suficiente hierro para proveer la cantidad de este elemento necesaria para la peroxidación, donde la concentración final en la mezcla de incubación fue de 2,15 µM de hierro en estado ferroso-férrico. El proceso se cuantificó mediante un programa de quimioluminiscencia empleando un contador de centelleo líquido Packard 1900 RT (Wright *et al.*, 1979). La lectura de quimioluminiscencia (cuantificada como cuentas por minuto, cpm) se realizó cada 10 min, durante 180 min. En todos los casos se realizó en forma simultánea un blanco sin ascorbato (membranas + buffer + H₂O₂) que fue considerado como nativo, un testigo al cual, además de los componentes mencionados en el vial nativo, se adicionó un agente prooxidante (en este caso se utilizó ácido ascórbico 0,4 mM, a la vez que se ensayaron diferentes concentraciones de extractos metanólicos de *C. parqui* y *P. glauca* (0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg y 0,4 mg).

II.5. Ensayos de genotoxicidad

II.5.1. Ensayo de electroforesis de una sola célula (Ensayo Cometa)

Electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa)

El ensayo cometa (EC), conocido también como electroforesis de células aisladas, constituye uno de los principales métodos para estimar el daño en el ADN, tanto en biomonitorio poblacional y en pruebas de genotoxicidad, como en investigaciones relacionadas al daño y reparación en el ADN (Collins, 2004).

Este ensayo consiste en someter a electroforesis una muestra de células previamente embebidas en agarosa, colocadas sobre un portaobjetos y lisadas en una solución conteniendo

el detergente tritón X-100. La electroforesis produce la migración del ADN nuclear de cada célula a lo largo del campo eléctrico, en forma proporcional a la cantidad de daño presente. De esta manera, su nombre se debe a la imagen que se obtiene luego de la corrida electroforética, la cual se asemeja a un “cometa” formado por una *cabeza*, cuyo componente principal es el ADN nuclear intacto, y una *cola*, constituida por los fragmentos del ADN dañado.

Tanto Singh *et al.* (1988) como Olive (1999) propusieron, de manera independiente, desarrollar la lisis celular a un pH elevado. La utilización de soluciones alcalinas permitió la formación de colas de cometas más pronunciadas, extendiendo el rango de daño que puede ser detectado (Collins *et al.*, 2001). En la actualidad la versión del ensayo más utilizada para identificar los efectos de los agentes genotóxicos es la alcalina (pH>13), y resulta fundamental para la visualización de los fragmentos generados por la ruptura de una o ambas hebras del ADN. Esta versión es capaz de detectar rupturas de simple y doble cadena en el ADN, sitios lábiles al álcali (como por ejemplo sitios apurínicos), entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas, y rupturas de cadena simple asociadas a la escisión incompleta de sitios de reparación (Choucroun *et al.*, 2001). Los fragmentos de ADN son liberados durante la exposición a la solución de lisis y migran como consecuencia de la electroforesis (Choucroun *et al.*, 2001). Dada su carga negativa, tenderán a desplazarse a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico. La distancia de migración de los fragmentos de ADN dependerá directamente del tamaño de estos. Es importante destacar que las lesiones en el ADN, resultantes en ruptura de cadena, incrementan la migración del ADN en el gel de agarosa, mientras que los enlaces cruzados de ADN-ADN y ADN-proteína resultan en un retraso en la migración comparado con sus correspondientes controles (Tice *et al.*, 2000). Así

se asume que a mayor cantidad de rupturas se corresponde una mayor cantidad de fragmentos de bajo peso molecular, aumentando la cola del cometa y, por ende, sus parámetros.

Las principales ventajas de este ensayo incluyen: a) la obtención de datos a nivel de células individuales, permitiendo posteriormente realizar análisis estadísticos robustos; b) la necesidad de obtener pocas células por punto experimental; c) la sensibilidad para detectar el ADN dañado; d) su utilización con cualquier tipo celular eucariota, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

Protocolo

Se implementó de acuerdo con el método de Singh *et al.* (1988), con algunas modificaciones menores. El protocolo se desarrolló de la siguiente manera:

- Se toman 30 μ l de solución celular y se suspenden en 170 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF).
- Se siembran 2 portaobjetos, previamente tratados con 100 μ l de agarosa de punto de fusión normal (APFN).
- Las muestras se cubren con un cubreobjetos y se mantienen a 4°C durante 10 min.
- Posteriormente se retiran los cubreobjetos y se conservan los preparados en solución de lisis durante 2 h a 4°C.
- A continuación, los portaobjetos se transfieren a la cuba de electroforesis horizontal cubiertos con solución buffer pH >13 durante 20 min a 4°C.
- La corrida electroforética se realiza bajo las siguientes condiciones: 20 voltios, 200 mA durante 20 min a 4°C.
- Una vez completada la corrida electroforética, se neutraliza el pH de las muestras por medio de tres lavados con Tris-Cl a temperatura ambiente.

- Para la visualización de las muestras los portaobjetos se tiñen con 20 μ l de colorante Syber Green 1.

- Por último, se realiza el análisis al microscopio de fluorescencia con un objetivo 40X.

Se utiliza un microscopio Olympus modelo BX 40 equipado con un cubo de fluorescencia Olympus modelo U-MNB con filtro de excitación de 470-490 nm y de emisión de 520 nm de longitud de onda. Todo el protocolo se realiza en oscuridad, para evitar el daño que podría causar la luz sobre el material genético.

Análisis de las imágenes

Se realizan dos preparados por punto experimental y se estudian al azar 100 imágenes por cada uno. A cada una de ellas se le asigna un valor entre 0 a 4, de acuerdo con el nivel de daño observado, siguiendo los criterios de Collins., 2004 detallados a continuación:

a. Grado 0: células sin daño en el ADN. La totalidad del ADN se encuentra en la cabeza del cometa (Fig. 24a).

b. Grado 1: células con daño leve en su ADN. La mayor parte del ADN se encuentra en la cabeza del cometa y pocos fragmentos en su cola (Fig. 24b).

c. Grado 2: células con daño intermedio en su ADN. La mayor parte del ADN se encuentra en la cabeza y varios fragmentos en la cola del cometa (Fig. 24c).

d. Grado 3: células con daño severo en su ADN. La menor parte del ADN se encuentra en la cabeza y muchos fragmentos en la cola del cometa (Fig. 24d).

e. Grado 4: células con daño grave en su ADN. La cabeza del cometa prácticamente desaparece de la imagen, ya que casi la totalidad del ADN se encuentra formando su cola (Fig. 24e).

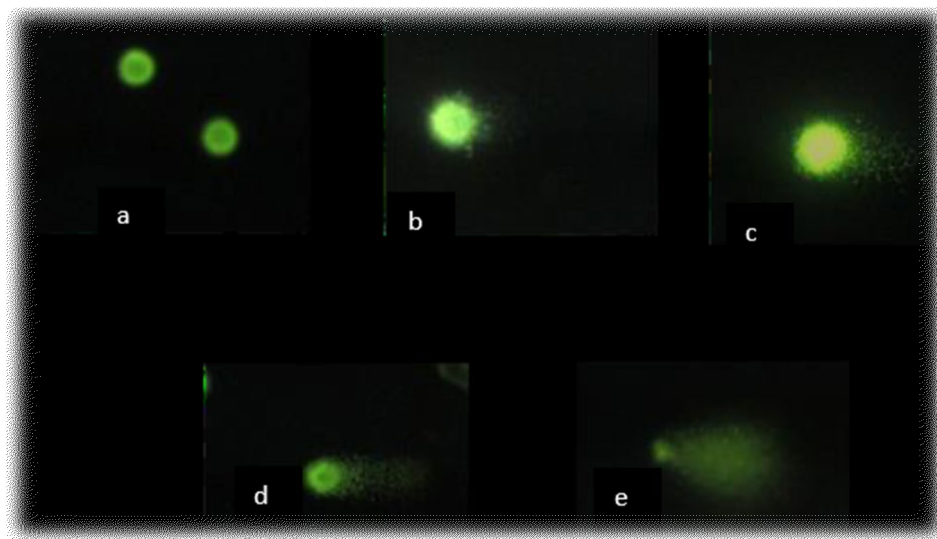


Figura 24. Clasificación de los niveles de daño citomolecular (Collins, 2004).

De este modo, el puntaje total obtenido para cada gel podría oscilar entre 0 “unidades arbitrarias”, cuando todas la células analizadas se encuentran sin daño; y 400 “unidades arbitrarias”, cuando todas las células analizadas tienen el mayor de los daños.

En base a esta clasificación se estable para cada uno de los geles un índice de daño genético (ID), según la siguiente fórmula (Collins, 2004):

$$\text{ID} = \frac{1 \times \text{NG1} + 2 \times \text{NG2} + 3 \times \text{NG3} + 4 \times \text{NG4} \times 100}{\text{Total de células analizadas}}$$

Diseño experimental

En primera instancia se realizan los cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO). Se siembran $0,3 \times 10^6$ células/ml en frascos Falcon T-25 utilizando como medio base al HAM F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con el agregado de antibióticos (60 UI de Penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Estreptomicina) (Laboratorio Bagó, Buenos Aires, Argentina), para evitar el crecimiento bacteriano. El extracto se diluye en DMSO (4,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Los cultivos se mantienen a 37°C en 5% de CO_2 , durante 48 h.

Se establecen 7 puntos experimentales:

1. Control negativo (CN): células sin tratar
2. Tratamiento 1 *Cestrum parqui/Pascaliala glauca* (E1): 0,1 mg/ml
3. Tratamiento 2 *Cestrum parqui/Pascaliala glauca* (E2): 0,05 mg/ml
4. Tratamiento 3 *Cestrum parqui/Pascaliala glauca* (E3): 0,025 mg/ml
5. Tratamiento 4 *Cestrum parqui/Pascaliala glauca* (E4): 0,0125 mg/ml
6. Control positivo (CP): bleomicina 1 μ g/ml
7. Control de DMSO (CDMSO): 4,5 μ l/ml

II.5.2. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)

La simplicidad de la técnica y la variedad de aplicaciones que posee el ensayo CBMN, tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes tipos celulares, lo convirtieron en una herramienta de suma utilidad para la evaluación de anomalías cromosómicas (Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Este ensayo ha sido utilizado a menudo para la evaluación de los efectos causados por agentes químicos, físicos o biológicos sobre el genoma (Fenech, 2007).

El ensayo de micronúcleos fue propuesto por primera vez en 1976 y desde entonces ha sufrido varias modificaciones. La más importante fue la utilización, en bajas concentraciones, de la citocalasina B producida por el hongo *Helminthosporium dematioideum*. Esta bloquea la citocinesis permitiendo obtener células binucleadas (BN) (Fenech y Morley, 1986). De esta manera, la utilización de la citocalasina permitió el análisis de aquellas células que hubieran sufrido la injuria a evaluar durante ese ciclo celular, evitando el conteo de aquellas células que se hallaran en interfase y que aún no se hubieran dividido (Fenech, 2007).

Previo a comenzar el análisis, es necesario demostrar que la proliferación celular es suficiente para asegurar que la mayoría de las células contadas deriven de la primera o de la primera y segunda división luego del tratamiento. En este sentido, se debe calcular el índice de división nuclear (IDN):

$$\text{IDN} = \frac{1 \times \text{N}^\circ \text{ de células mononucleadas} + 2 \times \text{N}^\circ \text{ de células binucleadas} + 3 \times \text{N}^\circ \text{ de células trinucleadas y tetranucleadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas (500)}}$$

Con este ensayo se puede evaluar el daño cromosómico a través de la estimación de la frecuencia de micronúcleos (MNi), puentes nucleoplásmicos (NPBs) y brotes nucleares (NBUDs). Los MNi consisten en fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas completos que no se han distribuido adecuadamente en ninguno de los dos núcleos hijos durante la anafase. De este modo la técnica permite analizar procesos clastogénicos y/o aneugénicos, respectivamente (Fenech, 2010, Fig. 25). Los NPBs que se forman entre los núcleos de una célula BN, proveen una medida de la frecuencia de rearrreglos cromosómicos, producto de cromosomas dicéntricos que no se han separado correctamente en anafase (Umegaki y Fenech, 2000). Son utilizados como biomarcadores de reparación errónea del ADN y/o de fusiones teloméricas. Por su parte, los NBUDs presentan una morfología semejante a los MNi, pero se encuentran unidos por un pedúnculo al núcleo celular. Según Shimizu *et al.* (1998, 2000), la amplificación del ADN se localiza en sitios específicos de la periferia del núcleo y se elimina a través de brotes nucleares que forman los MNi durante la fase S del ciclo celular.

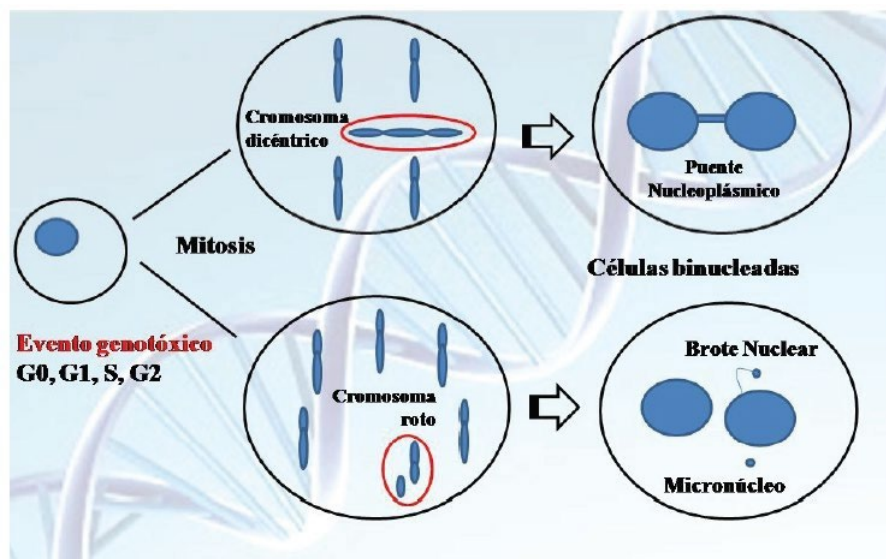


Figura 25. Diagrama de eventos genotóxicos: micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares. Modificado de Fenech *et al.* (2010).

Protocolo

En primera instancia se realizan los cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO). Se siembran $0,3 \times 10^6$ células/ml en frascos Falcon T-25 utilizando como medio base al HAM F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con el agregado de antibióticos (60 UI de Penicilina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Estreptomicina) (Laboratorio Bagó, Buenos Aires, Argentina), para evitar el crecimiento bacteriano. El extracto se diluye en DMSO (4,5 $\mu\text{l/ml}$). Los cultivos se mantienen a 37 °C en 5% de CO₂ durante 48 h. Se establecen 7 puntos experimentales:

- 1 Control negativo (CN): células sin tratar
- 2 Tratamiento 1 → *Cestrum parqui/Pascalía glauca* (E1): 0,1 mg/ml
- 3 Tratamiento 2 → *Cestrum parqui/Pascalía glauca* (E2): 0,05 mg/ml
- 4 Tratamiento 3 → *Cestrum parqui/Pascalía glauca* (E3): 0,025 mg/ml
- 5 Tratamiento 4 → *Cestrum parqui/Pascalía glauca* (E4): 0,0125 mg/ml
- 6 Control positivo (CP): bleomicina 1 $\mu\text{g/ml}$
- 7 Control de DMSO (CDMSO): 4,5 $\mu\text{l/ml}$

La técnica se lleva a cabo de acuerdo con el método de Fenech y Morley (1986), con las modificaciones propuestas posteriormente por Fenech (2007). Brevemente, a las 24 h de cultivo se adicionan 100 μ l de citocalasina B (3 μ g/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA) y el extracto de cada planta se rotaevapora a sequedad y se resuspende en DMSO. Finalizado el tiempo de cultivo se remueven las células con tripsina y se trasvasa el contenido del frasco a un tubo Falcon con el cual se centrifugan por 10 min. a 1200 rpm. Luego, el pellet se resuspende en fijador I (cloruro de sodio-metanol-acético 6:5:1). Se realizan dos cambios más con fijador II (metanol-acético 5:1), previa centrifugación por 10 min. a 1200 rpm. Después de 24 h de reposo en heladera se procede al goteo de material en portaobjetos. Los preparados se tiñen con colorante Giemsa durante 10 min. y se analizan 1000 células por cada uno de los 7 puntos experimentales, de acuerdo con los criterios de Fenech. Para tal fin, se utiliza un microscopio óptico con objetivo de magnitud de 40x. Las células son clasificadas siguiendo los criterios establecidos por Fenech (2007), según se detalla a continuación:

- Células binucleadas (CB): corresponde a aquellas células detenidas en citocinesis, con dos núcleos principales, que no poseen daño genético.
- Células binucleadas con micronúcleos (MNi): son aquellas células que poseen núcleos pequeños además de ambos núcleos principales.
- Células binucleadas con puentes nucleoplásmicos (NPBs): células con puentes nucleoplásmicos entre ambos núcleos principales.
- Células binucleadas con brotes nucleares (NBUDs): presencia de brotes de cromatina unidos a alguno de los núcleos principales por un pedúnculo.

II.6. Análisis estadístico

Los resultados de la quimioluminiscencia se expresan como media \pm ES de las determinaciones independientes. Los datos son evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). El criterio estadístico para la significancia es seleccionado con valores de p diferentes, que son indicados en cada caso.

Para cada ensayo de micronúcleos se realizan 3 repeticiones y se calculan los promedios correspondientes. Se utiliza el análisis de la varianza (ANOVA simple) para aquellas variables normalmente distribuidas. Cuando las diferencias resultan significativas, se realiza la prueba de contraste múltiple de rango. Para las variables que no presentan una distribución normal se realiza el análisis de Kruskal Wallis. La evaluación se lleva a cabo a través del programa estadístico Statgraphics® 5.1 software (Manugistics Inc., Rockville, MD) y se considera $p < 0,05$.

Para cada ensayo cometa, se realizan 3 repeticiones y se calculan los promedios correspondientes. Se utiliza el análisis de la varianza (ANOVA simple) para aquellas variables normalmente distribuidas. Cuando las diferencias resultan significativas, se realiza la prueba de contraste múltiple de rangos. Para las variables que no presentan una distribución normal se realiza el análisis de Kruskal Wallis. La evaluación se lleva a cabo a través del programa estadístico Statgraphics® 5.1 software (Manugistics Inc., Rockville, MD) y se considera $p < 0,05$.

CAPÍTULO III

III. RESULTADOS

III.1. *Cestrum parqui*

III.1.1. Fitoquímica

La fitoquímica realizada sobre el extracto metanólico de *Cestrum parqui* se presenta en la Tabla 2. Demostró la presencia en la fracción A de flavonoides (Fig. 26), -OH polifenólicos (Fig. 27), taninos (Fig. 28), lípidos (Fig. 29) y glúcidos (Fig. 30). En el caso de la fracción B, se verificó la presencia de esteroides, no así triterpenos (Fig. 31), ni antraquinonas (Fig. 32). En la fracción C se evidenció la existencia de alcaloides (Fig. 33), y no se hallaron cardenólidos (Fig. 34) ni leucoantocianinas (Fig. 35). También se demostró la presencia de saponinas a partir de la reacción para evaluar la producción de espuma por agitación (Fig. 36).

| Determinaciones | Fracción A | Fracción B | Fracción C |
|---|------------|-------------------------------|------------|
| Shinoda | + | | |
| Cloruro férrico | + | | |
| Gelatina | + | | |
| Iodo | + | | |
| Fenol 5% + H ₂ SO ₄ concentrado | + | | |
| Liebermann-Burchard | | + esteroides - triterpenos | |
| Bornträger | | - | |
| Dragendorff | | | + |
| Legal | | | - |
| Rosenheim | | | - |
| Reacciones directas (saponinas) | + | | |

Tabla 2. Resultados de la fitoquímica de las tres fracciones del extracto metanólico de *Cestrum parqui*.

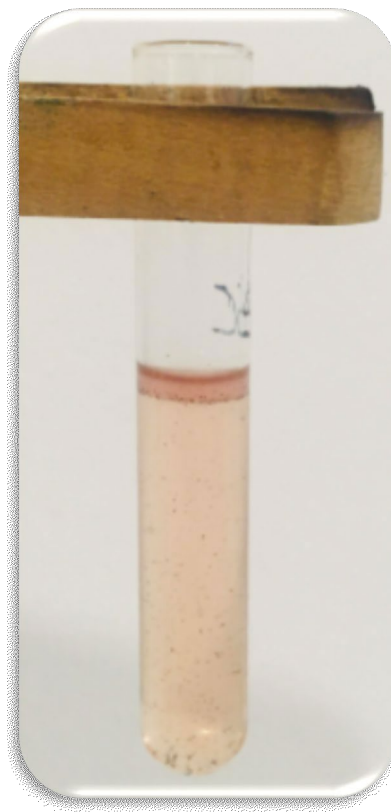


Figura 26. Reacción de Shinoda positiva para la identificación de flavonoides.



Figura 27. Reacción de cloruro férrico positiva para la identificación de -OH fenólicos.



Figura 28. Reacción de gelatina positiva para la identificación de taninos.



Figura 29. Reacción de vapores de yodo positiva para la identificación de lípidos.

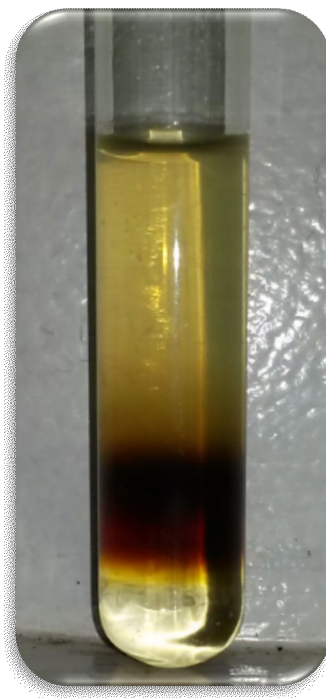


Figura 30. Reacción de fenol al 5% + H₂SO₄ concentrado positiva para la identificación de glúcidos.

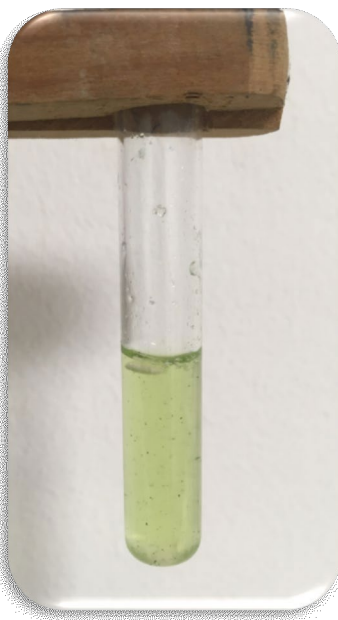


Figura 31. Reacción de Liebermann-Burchard positiva para la identificación de esteroides y negativa para la identificación de triterpenos.



Figura 32. Reacción de Bornträger negativa para la identificación de antraquinonas.

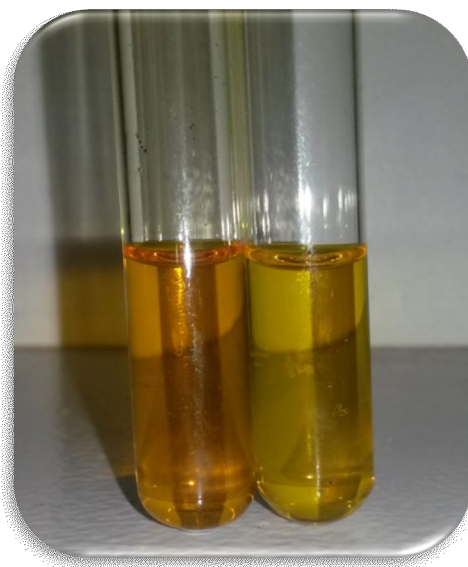


Figura 33. Reacción de Dragendorff positiva para la identificación de alcaloides. A la izquierda se muestra la fracción C con el reactivo de Dragendorff, a la derecha se realizó un control para descartar falsos positivos.



Figura 34. Reacción de Legal negativa para la identificación de cardenólidos.



Figura 35. Reacción de Rosenheim negativa para la identificación de leucoantocianinas.



Figura 36. Reacción de agitación para obtención de espuma, positiva para la identificación de saponinas.

III.1.2. Ensayos de peroxidación

La incubación de microsomas de hígado de rata en presencia del sistema de peroxidación no enzimático *in vitro* ascorbato-Fe⁺² resultó en la peroxidación de estos y se cuantificó mediante quimioluminiscencia. Luego de la incubación de microsomas en un sistema ascorbato-Fe⁺² a 37°C durante 180 min (Fig. 37), las cpm originadas por emisión lumínica fueron menores en el grupo con extracto de *Cestrum parqui* comparadas con el grupo control.

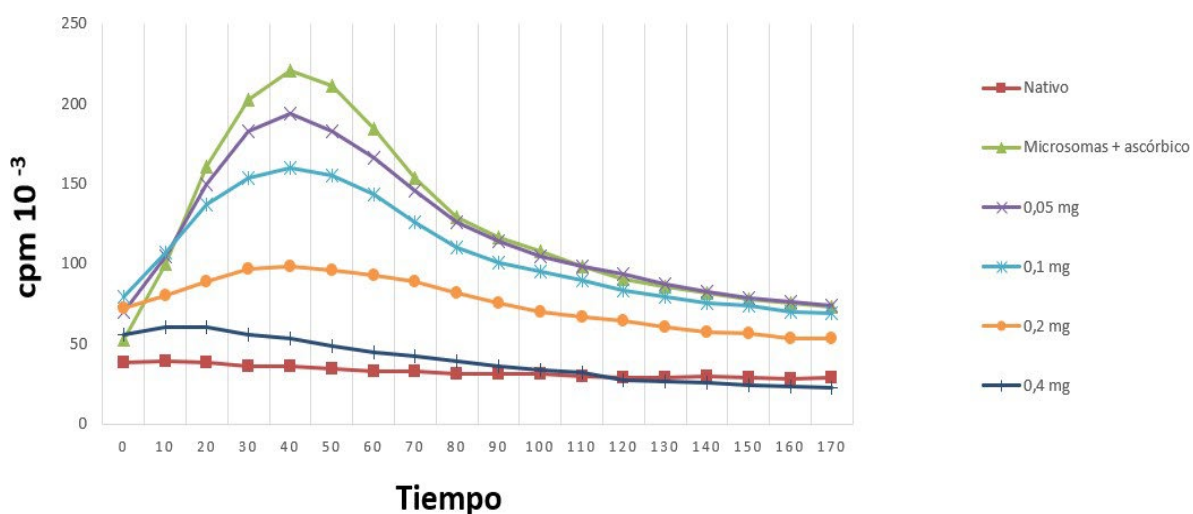


Figura 37. Peroxidación (quimioluminiscencia) de microsomas de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Cestrum parqui* en función del tiempo (180 min). Las lecturas son expresadas en cpm realizadas cada 10 min, promedio de seis experimentos.

La Fig. 38 muestra el total de emisión lumínica obtenida del grupo con extracto y del grupo control. Los resultados de las muestras fueron analizados con análisis de ANOVA y test de t , donde se expresan la media y error estándar de los promedios de las cpm de la muestra nativo (control) $585,67 \pm 52,77$; testigo (microsomas + ascórbico) $2223,50 \pm 88,64$; y las concentraciones utilizadas de *Cestrum parqui*: 0,05 mg/ml $2130,17 \pm 113,89$; 0,1 mg/ml $1907,67 \pm 117,05$; 0,2 mg/ml $1354,17 \pm 63,63$ y 0,4 mg/ml $714,33 \pm 52,76$.

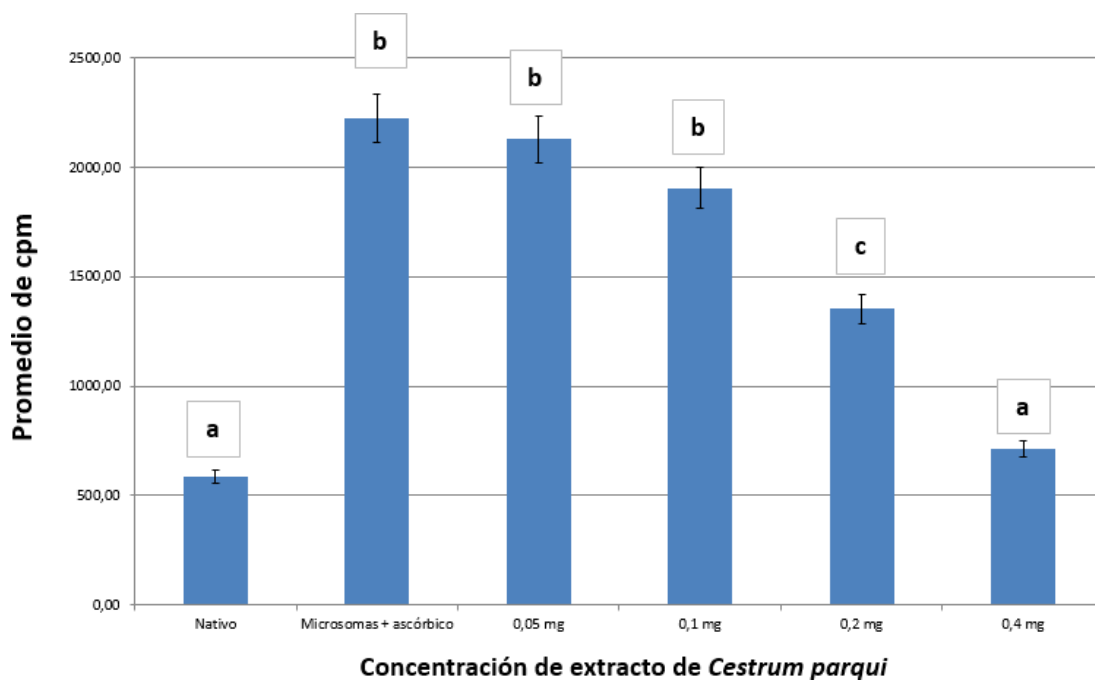


Figura 38. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de microsomas de hígado de rata con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Cestrum parqui*. Los datos son expresados como el promedio de las lecturas (cpm) \pm ES de seis experimentos. a-b-c: Letras diferentes entre sí indican que la probabilidad estadística es significativa ($p < 0,05$).

De igual manera se realizó la incubación de las mitocondrias en un sistema ascorbato- Fe^{+2} a 37°C durante 180 min (Fig. 39), las cpm originadas por emisión lumínica fueron menores en el grupo con extracto de *Cestrum parqui* comparadas con el grupo control.

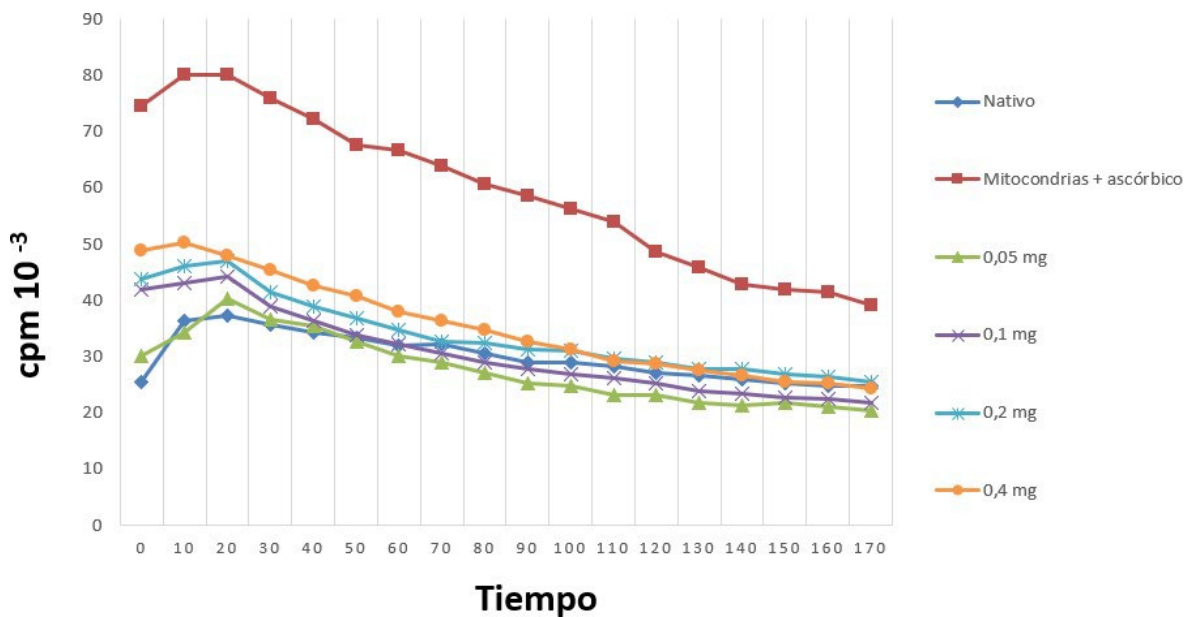


Figura 39. Peroxidación (quimioluminiscencia) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Cestrum parqui* en función del tiempo (180 min). Las lecturas son expresadas en cpm realizadas cada 10 min, promedio de seis experimentos.

La Fig. 40 muestra el total de emisión lumínica obtenida del grupo con extracto y del grupo control. Los resultados de las muestras fueron analizados con análisis de ANOVA y test de t, donde se expresan la media y su error estándar de los promedios de las cpm de la muestra nativo (control) $536,50 \pm 20,73$; testigo (mitocondrias + ascórbico) $1070,50 \pm 28,94$; y las concentraciones utilizadas de *Cestrum parqui*: 0,05 mg/ml $494,83 \pm 9,70$; 0,1 mg/ml $550 \pm 13,78$; 0,2 mg/ml $608,183 \pm 7,11$ y 0,4 mg/ml $635,83 \pm 8,98$.

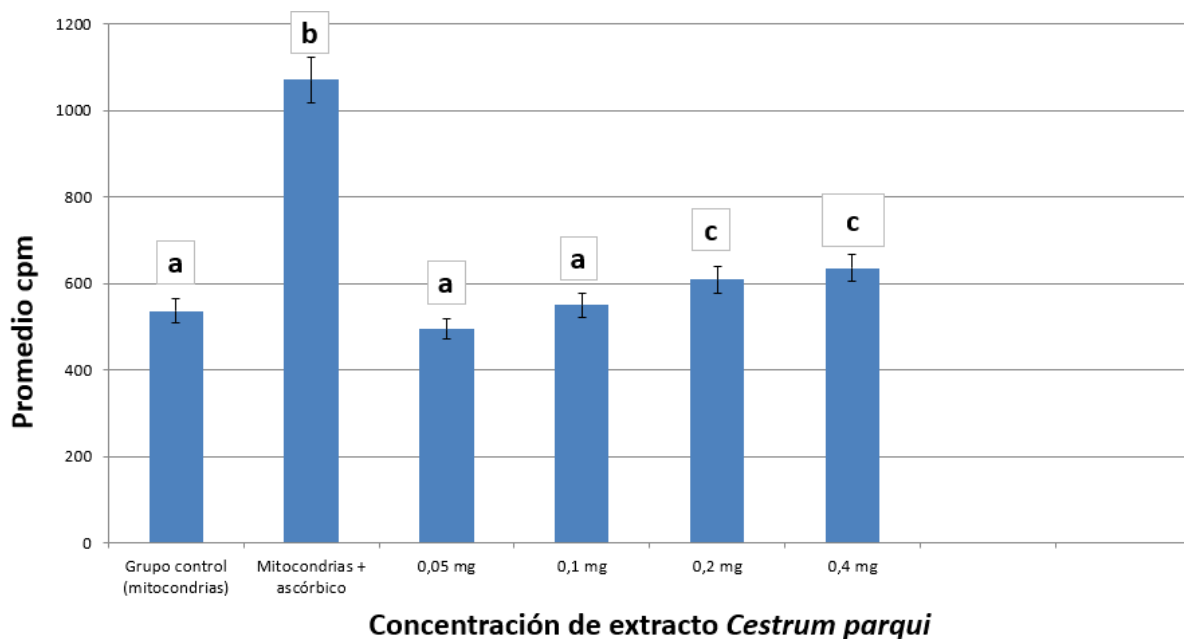


Figura 40. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Cestrum parqui*. Los datos son expresados como el promedio de las lecturas (cpm) \pm ES de seis experimentos. a-b-c: Letras diferentes entre sí indican que la probabilidad estadística es significativa ($p < 0,05$)

III.1.3. Ensayo de electroforesis de una sola célula

| Tratamientos | ID |
|--------------|------------------|
| CN | 2,16 \pm 1,16 |
| E1 | 3,33 \pm 1,40 |
| E2 | 8,7 \pm 3,82 |
| E3 | 7,91 \pm 3,07 |
| E4 | 22,12 \pm 4,87 |
| CP | 20,75 \pm 4,27 |
| CDMSO | 5,54 \pm 2,62 |

Tabla 3. Resultados obtenidos para el ensayo cometa, control negativo (CN), tratamientos con concentraciones de *Cestrum parqui* (E1-E4), control positivo (CP) y control con dimetilsulfóxido (CDMSO).

Como los datos no poseen distribución normal se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, que arrojó un valor de 111,46 ($p < 0,001$), indicando que existen diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 41). Para evaluar el origen de estas diferencias se realizó el análisis de contraste de múltiples rangos que indica que E4 (5) y CP (6) son grupos homogéneos y presentan diferencias significativas con los demás grupos. La dosis menor del extracto es la que produce mayor efecto genotóxico.

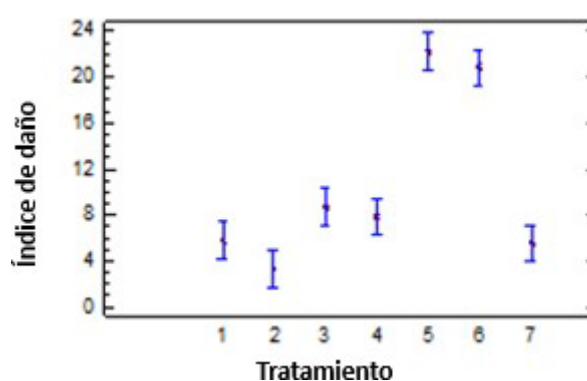


Figura 41. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el ensayo cometa.

III.1.4. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

| Tratamientos | IDN | Mni ‰ | NPBs ‰ | NBUDs ‰ |
|--------------|------|-------|--------|---------|
| CN | 1,45 | 5 | 0,4 | 1 |
| E1 | 2,2 | 2,6 | 0,6 | 0 |
| E2 | 1,95 | 6,6 | 1 | 0 |
| E3 | 1,38 | 7,8 | 1,6 | 0,6 |
| E4 | 1,17 | 9,6 | 0 | 0 |
| CP | 1,33 | 10,6 | 6,6 | 2,4 |
| CDMSO | 1,33 | 4 | 0,8 | 0 |

Tabla 4. Resultados obtenidos para el índice de división nuclear, frecuencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares generados, control negativo (CN), tratamientos con concentraciones de *Cestrum parqui* (E1-E4), control positivo (CP) y control con dimetilsulfóxido (CDMSO).

IDN

Presentó una distribución normal (curtosis -0,513621), por lo que se realizó el análisis de ANOVA simple. Las diferencias resultaron altamente significativas ($p < 0,0000$). A través del contraste múltiple de rango se pudo apreciar que a mayor concentración del extracto se observó un aumento significativo del IDN (viabilidad celular), mientras que a medida que disminuyó la concentración disminuyó de manera significativa el IDN (Fig. 42). Las concentraciones más altas de extracto de *C. parqui* (E1 y E2) generaron una viabilidad significativamente mayor incluso que el CN, mientras que la menor concentración (E4) presentó una viabilidad celular inferior que el CP. Quedaron conformados 4 grupos homogéneos, ordenados de menor a mayor viabilidad: a) E4, CP y CDMSO; b) CP, CDMSO, E3 y CN; c) E2; d) E1.

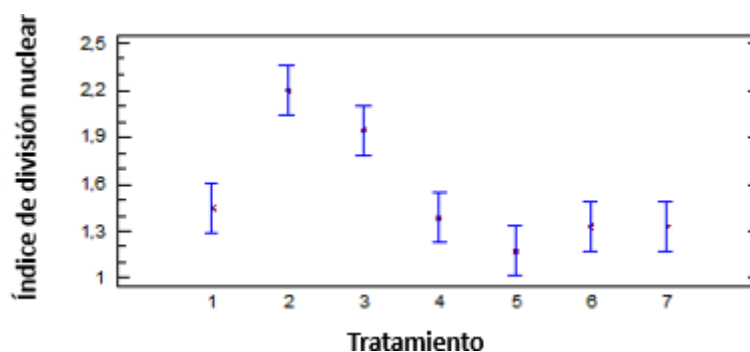


Figura 42. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el índice de división nuclear.

MNi

Las frecuencias tuvieron una distribución normal (curtosis -1,24386) y la comparación a través del ensayo de ANOVA resultó estadísticamente significativa ($p < 0,0000$). A través del contraste múltiple de rango se pudo apreciar que la mayor concentración del extracto (E1) presentó una disminución significativa de la frecuencia de MNi (daño cromosómico), mientras que a medida que disminuyó la concentración aumentaron de manera significativa

los MNi (Fig. 43). La mayor concentración (E1) presentó una disminución significativa del daño cromosómico incluso respecto del CN. Cada punto experimental conformó un grupo diferente, ordenados de menor a mayor daño cromosómico: a) E1; b) CDMSO; c) CN; d) E2; e) E3; f) E4; g) CP.

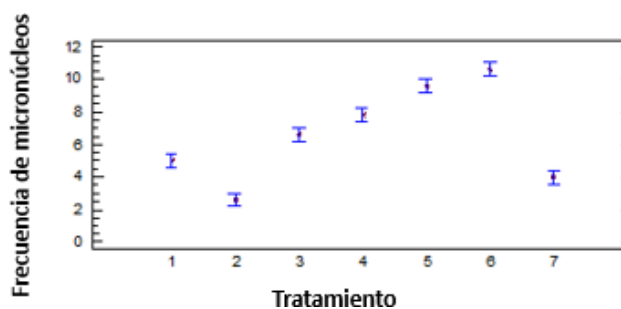


Figura 43. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la frecuencia de micronúcleos.

NPBs

No presentaron una distribución normal (curtosis 2,40218) y el análisis de Kruskal Wallis arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,00340367$). Las frecuencias resultaron bajas para todos los tratamientos (Fig. 44), solo CP presentó frecuencias significativamente aumentadas.

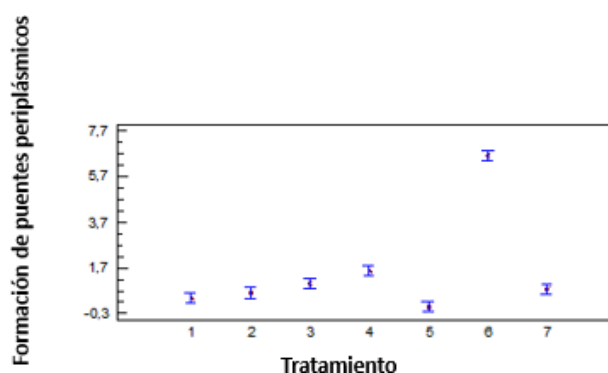


Figura 44. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de puentes periplásmicos.

NBUDS

Presentaron una distribución normal (curtosis 0,929822) y el análisis de ANOVA arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0000$). Las frecuencias resultaron bajas para todos los tratamientos (Fig. 45). A través del contraste múltiple de rango se observaron 4 grupos homogéneos: a) E1, E2, CDMSO, E4; b) E3; c) CN; d) CP.

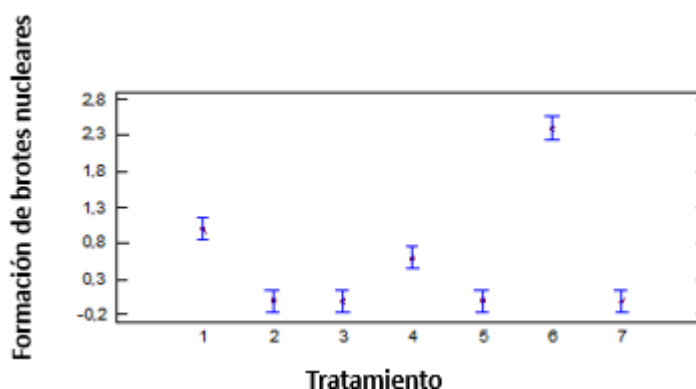


Figura 45. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de brotes nucleares.

III.2. *Pascalía glauca*

III.2.1. Fitoquímica

Los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica realizada sobre el extracto metanólico de *Pascalía glauca* se expresan en la Tabla 5. Se demostró la presencia en la fracción A de flavonoides (Fig. 46), -OH polifenólicos (Fig. 47), taninos (Fig. 48), lípidos (Fig. 49) y glúcidos (Fig. 50). En el caso de la fracción B, se hallaron esteroides, pero no triterpenos (Fig. 51) ni antraquinonas (Fig. 52). En la fracción C se evidenció la existencia de alcaloides (Fig. 53); no se hallaron cardenólidos (Fig. 54) ni leucoantocianinas (Fig. 55). Además, se demostró la presencia de saponinas a partir de la reacción directa para evaluar la producción de espuma por agitación (Fig. 56).

| Determinaciones | Fracción A | Fracción B | Fracción C |
|---|------------|-------------------------------|------------|
| Shinoda | + | | |
| Cloruro férrico | + | | |
| Gelatina | + | | |
| Iodo | + | | |
| Fenol 5% + H ₂ SO ₄ concentrado | + | | |
| Liebermann-Burchard | | + esteroides - triterpenos | |
| Bornträger | | - | |
| Dragendorff | | | + |
| Legal | | | - |
| Rosenheim | | | - |
| Reacciones directas (saponinas) | + | | |

Tabla 5. Resultados de la fitoquímica de las tres fracciones del extracto metanólico de *Pascalía glauca*.

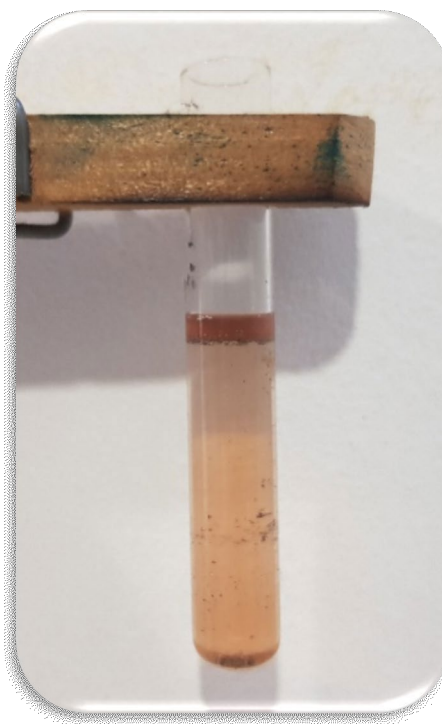


Figura 46. Reacción de Shinoda positiva para la identificación de flavonoides.



Figura 47. Reacción de cloruro férrico positiva para la identificación de $-OH$ fenólicos.



Figura 48. Reacción de gelatina positiva para la identificación de taninos.

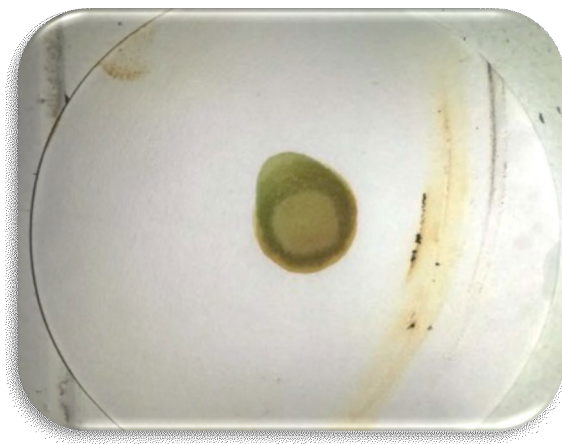


Figura 49. Reacción de vapores de iodo positiva para la identificación de lípidos.

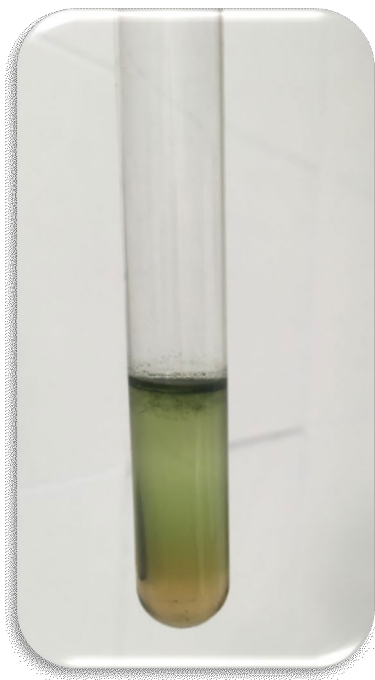


Figura 50. Reacción de fenol al 5% + H_2SO_4 concentrado positiva para la identificación de glúcidos.

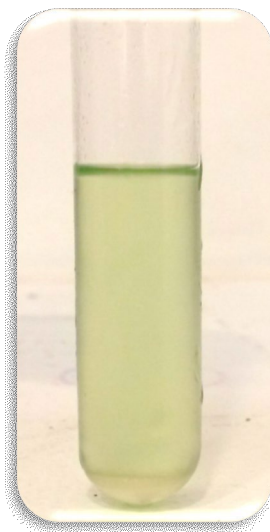


Figura 51. Reacción de Liebermann-Burchard positiva para la identificación de esteroides y negativa para triterpenos.

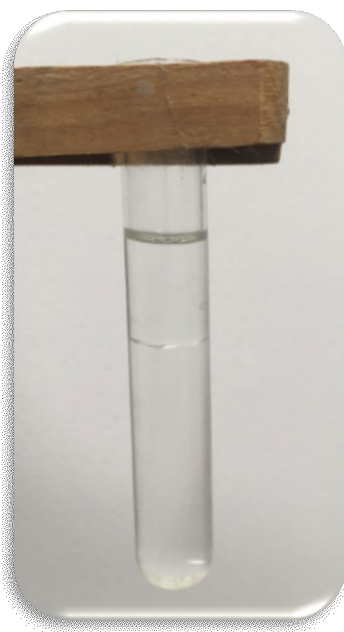


Figura 52. Reacción de Bornträger negativa para la identificación de antraquinonas.

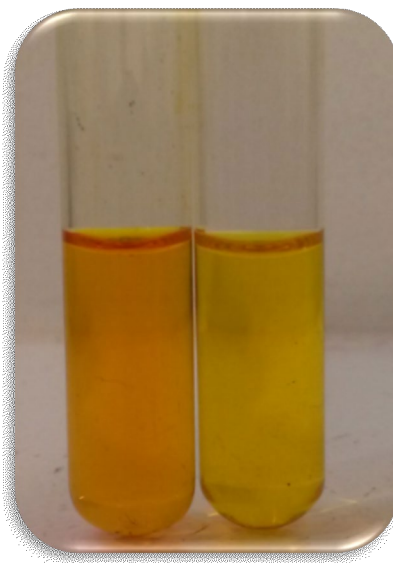


Figura 53. Reacción de Dragendorff positiva para la identificación de alcaloides. A la izquierda se muestra la fracción C con el reactivo de Dragendorff, a la derecha se realizó un control para descartar falsos positivos.



Figura 54. Reacción de Legal negativa para la identificación de cardenólidos.



Figura 55. Reacción de Rosenheim negativa para la identificación de leucoantocianinas.



Figura 56. Reacción de agitación para obtención de espuma, positiva para la identificación de saponinas.

III.2.2. Ensayos de peroxidación

La incubación de microsomas de hígado de rata en presencia del sistema de peroxidación no enzimático *in vitro* ascorbato-Fe⁺² resultó en la peroxidación de estos y se analizó mediante quimioluminiscencia. Luego de la incubación de microsomas en un sistema ascorbato-Fe⁺² a 37°C durante 180 min. (Fig. 57), las cpm originadas por emisión lumínica fueron menores en el grupo con extracto de *Pascalía glauca* comparadas con el grupo control.

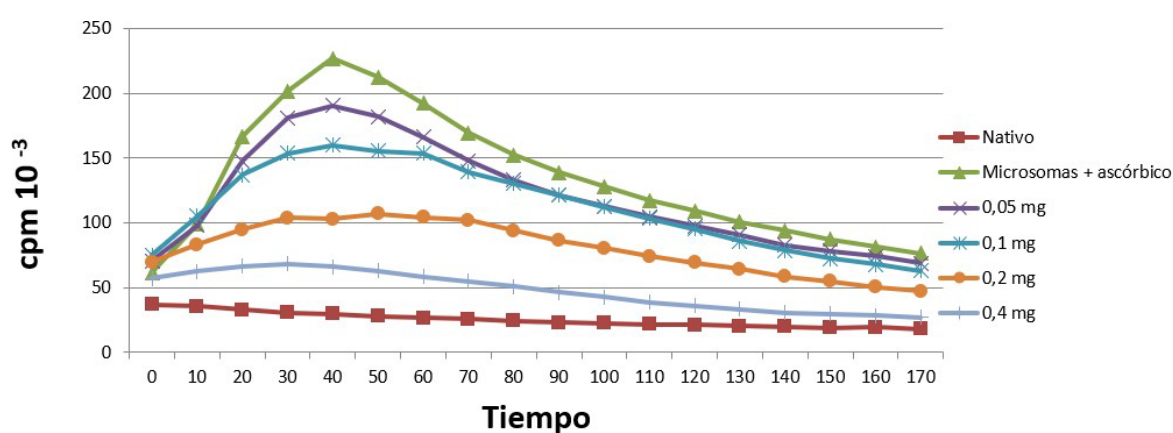


Figura 57. Peroxidación (quimioluminiscencia) de microsomas de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Pascalía glauca* en función del tiempo (180 min). Las lecturas son expresadas en cpm realizadas cada 10 min, promedio de seis experimentos.

La Fig. 58 muestra el total de emisión lumínica obtenida del grupo con extracto y del grupo control. Los resultados de las muestras fueron analizados con análisis de ANOVA y test de t, donde se expresan la media y su error estándar de los promedios de las cpm de la muestra nativo (control) $453,83 \pm 15,18$; testigo (microsomas + ascórbico) $2415,50 \pm 63,64$; y las concentraciones utilizadas de *Pascalía glauca*: 0,05 mg/ml $2147,50 \pm 92,13$; 0,1 mg/ml $2010 \pm 90,45$; 0,2 mg/ml $1447,67 \pm 52,40$ y 0,4 mg/ml $860,67 \pm 44,58$.

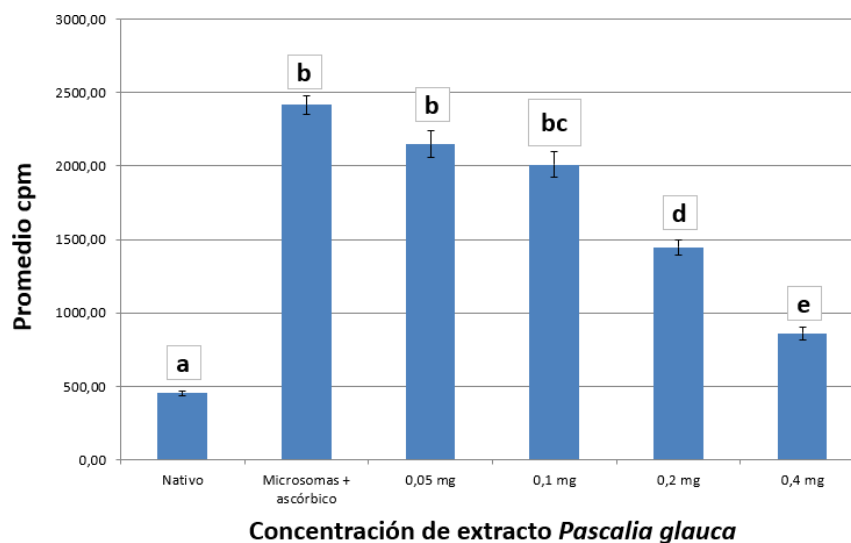


Figura 58. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de microsomas de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Pascalía glauca*. Los datos son expresados como el promedio de las lecturas (cpm) \pm ES de seis experimentos. a-b-c-d-e: Letras diferentes entre sí indican que la probabilidad estadística es significativa ($p < 0,05$).

De igual manera se realizó la incubación de las mitocondrias en un sistema ascorbato- Fe^{+2} a 37°C durante 180 min (Fig. 59), las cpm originadas por emisión lumínica fueron menores en el grupo con extracto de *Pascalía glauca* comparadas con el grupo control.

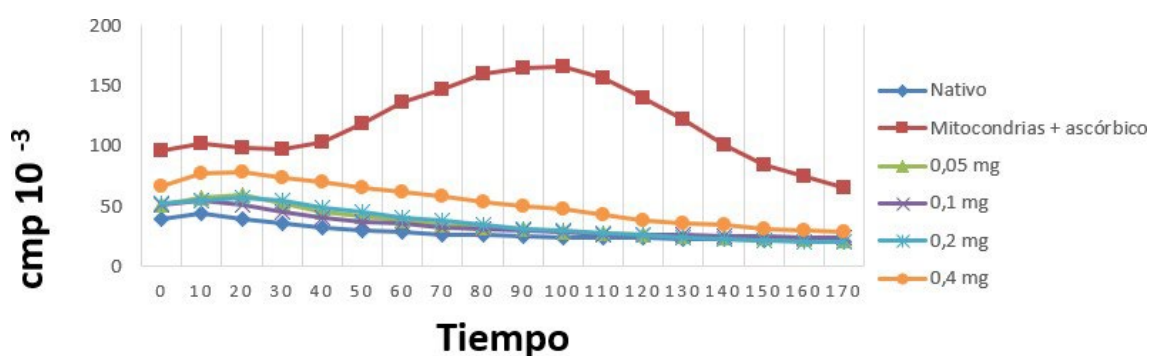


Figura 59. Peroxidación (quimioluminiscencia) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Pascalía glauca* en función del tiempo (180 min). Las lecturas son expresadas en cpm realizadas cada 10 min, promedio de seis experimentos.

La Fig. 60 muestra el total de emisión lumínica obtenida del grupo con extracto y del grupo control. Los resultados de las muestras fueron analizados mediante ANOVA y test de t , donde se expresan la media y su error estándar de los promedios de las cpm de la muestra nativo (control) $512,33 \pm 2,99$; testigo (mitocondrias + ascórbico) $2131,83 \pm 79,23$; y las concentraciones utilizadas de *Pascalía glauca*: 0,05 mg/ml $646 \pm 17,51$; 0,1 mg/ml $646,17 \pm 15,20$; 0,2 mg/ml $653,17 \pm 13,13$ y 0,4 mg/ml $946 \pm 22,34$.

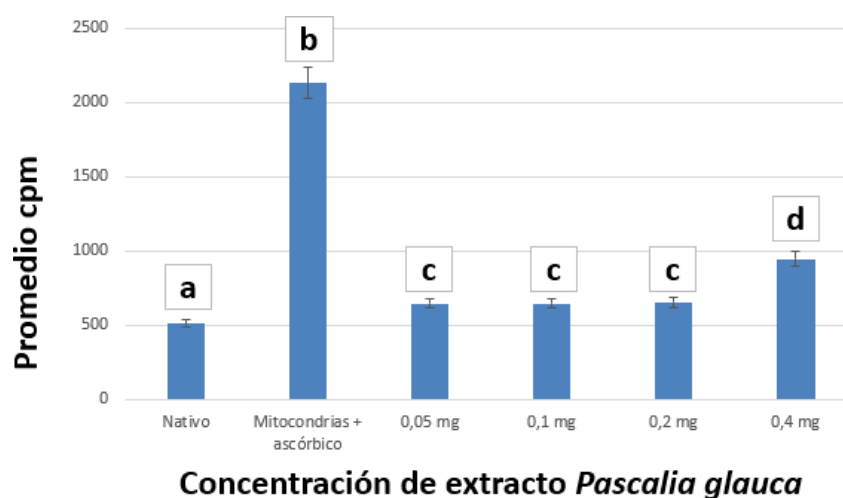


Figura 60. Peroxidación (quimioluminiscencia total) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Pascalía glauca*. Los datos son expresados como el promedio de las lecturas (cpm) \pm ES de seis experimentos. a-b-c-d: Letras diferentes entre sí indican que la probabilidad estadística es significativa ($p < 0,05$).

III.2.3. Ensayo de electroforesis de una sola célula

| Tratamientos | ID |
|--------------|--------------|
| CN | 1,92 ± 0,58 |
| E1 | 91,25 ± 1,16 |
| E2 | 77,92 ± 1,73 |
| E3 | 37,42 ± 2,31 |
| E4 | 16,33 ± 2,89 |
| CP | 60,50 ± 3,47 |
| CDMSO | 12,33 ± 4,05 |

Tabla 6. Resultados obtenidos para el ensayo cometa, control negativo (CN), tratamientos con concentraciones de *Pascalia glauca* (E1-E4), control positivo (CP) y control con dimetilsulfóxido (CDMSO).

Como los datos no poseen distribución normal se realizó el test de Kruskal-Wallis que arrojó un valor de 73,55, indicando que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$). Para evaluar el origen de estas diferencias se realizó el análisis de contraste de múltiples rangos que indica que solo E4 (5) y CP (7) son grupos homogéneos. Esto indicaría que todos los demás grupos tienen diferencias significativas entre sí. La dosis mayor del extracto es la que produce mayor efecto genotóxico, pero las dosis 2 y 3 también son significativamente diferentes de control negativo y el control del diluyente. La dosis menor tiene un comportamiento similar al control del diluyente, de modo que no se puede considerar que sea genotóxica.

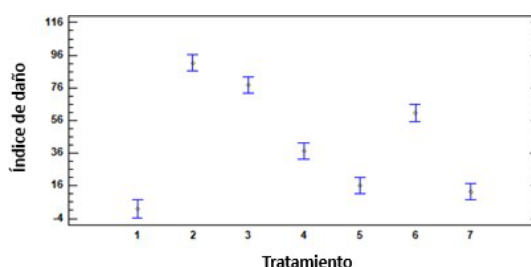


Figura 61. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el ensayo cometa.

III.2.4. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

| Tratamientos | IDN | MNi ‰ | NPBs ‰ | NBUDs ‰ |
|--------------|------|-------|--------|---------|
| CN | 1,55 | 9 | 2,3 | 0,8 |
| E1 | 1,65 | 27,6 | 9,9 | 6 |
| E2 | 1,55 | 16,4 | 6,2 | 2,7 |
| E3 | 1,67 | 10,8 | 1,6 | 1,2 |
| E4 | 1,51 | 8,6 | 2,2 | 0,4 |
| CP | 1,62 | 15,5 | 1,3 | 0,8 |
| CDMSO | 1,56 | 22,8 | 3,3 | 1,8 |

Tabla 7. Resultados obtenidos para el índice de división nuclear (IDN), frecuencia de micronúcleos (Mni ‰), puentes nucleoplásmicos (NPBs ‰), y brotes nucleares (NBUDs ‰) generados por control negativo (CN), tratamientos con concentraciones de *Pascalía glauca* (E1-E4), control positivo (CP) y control con dimetilsulfóxido (CDMSO).

IDN

Presentó una distribución normal (curtosis -0,688481), por lo que se realizó el análisis de ANOVA simple. Las diferencias no resultaron significativas ($p= 0,4265$). E1 y E3 mostraron un aumento no significativo del IDN (viabilidad celular), mientras que el menor IDN se observó para la menor concentración (E4) (Fig. 62).

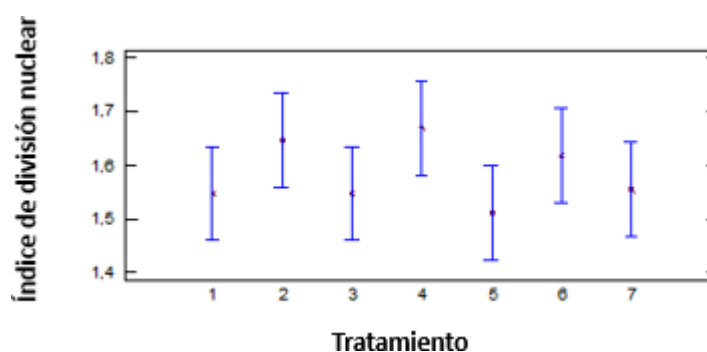


Figura 62. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para el índice de división nuclear.

MNi

Las frecuencias tuvieron una distribución normal (curtosis -0,921097) y la comparación a través del ensayo de ANOVA resultó estadísticamente significativa ($p < 0,0000$). A través del contraste múltiple de rango se pudo apreciar que la mayor concentración del extracto (E1) presentó un aumento significativo de la frecuencia de MNi (daño cromosómico), mientras que a medida que disminuyó la concentración se redujo de manera significativa la frecuencia de MNi (Fig. 63). La mayor concentración (E1) presentó la mayor frecuencia de daño cromosómico, incluso significativamente superior al CP. Por el contrario, la menor concentración (E4) mostró el menor daño, significativamente inferior incluso al del CN. Cada punto experimental conformó un grupo diferente, ordenados de menor a mayor daño cromosómico: a) E4; b) CN; c) E3; d) CP; e) E2; f) CDMSO; g) E1.

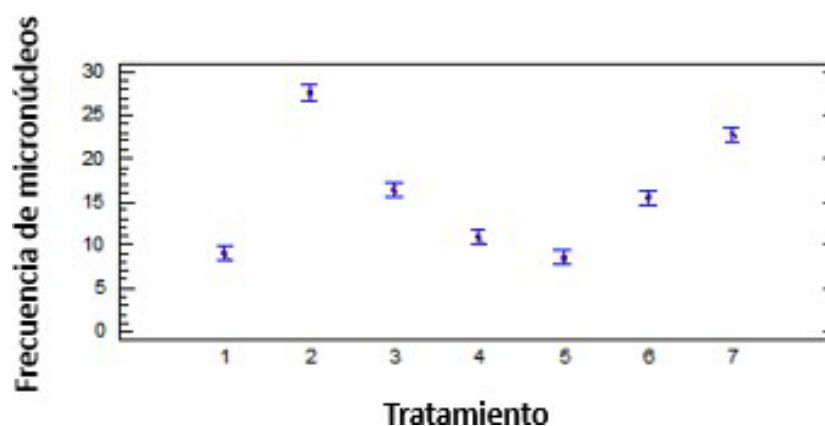


Figura 63. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la frecuencia de micronúcleos.

NPBs

Presentaron una distribución normal (curtosis 0,258236) y el análisis de ANOVA arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0000$). Las concentraciones más altas (E1 y E2) presentaron frecuencias significativamente aumentadas de rearrreglos cromosómicos

(Fig. 64). A través del contraste múltiple de rango se establecieron 6 grupos homogéneos: a) CP; b) E3; c) E4 y CN; d) CDMSO; e) E2; f) E1.

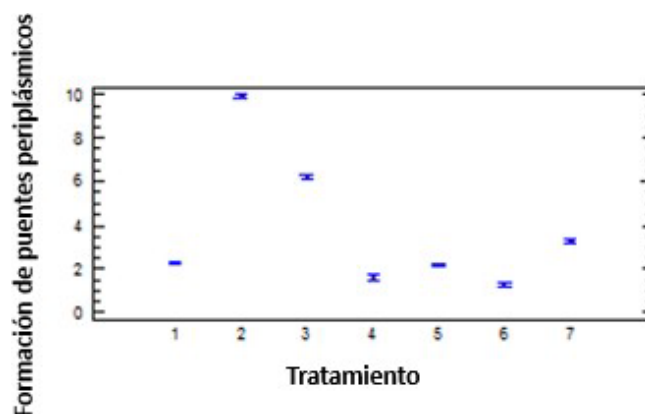


Figura 64. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de puentes periplásmicos.

NBUDS

Presentaron una distribución normal (curtosis 1,2878) y el análisis de ANOVA simple arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0000$). Nuevamente las concentraciones más altas (E1 y E2) presentaron frecuencias significativamente aumentadas de rearrreglos cromosómicos (Fig. 65). A través del contraste múltiple de rango se establecieron 6 grupos homogéneos: a) E4; b) CN y CP; c) E3; d) CDMSO; e) E2; f) E1.

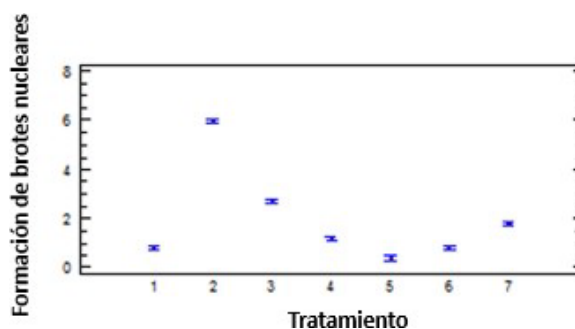


Figura 65. Diagrama de media e intervalos al 95 % de la LSD de Fisher para la formación de brotes nucleares.

CAPÍTULO IV

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

IV.1. DISCUSIÓN

IV.1.1. Fitoquímica

La fitoquímica estudia principios activos presentes en las plantas y sus propiedades. Este estudio se realiza a través de lo que se conoce como marcha o caracterización fitoquímica, la cual consiste en una serie de reacciones químicas diversas en las que acontecen cambios en el color de una solución, formación de gas, espuma, turbidez, aparición de precipitados, etc. Se determina la existencia de un tipo de compuesto químico de manera cualitativa (Albornoz, 1980). Si bien son métodos menos específicos que las técnicas cuantitativas (como GC-MS o HPLC-MS), son ampliamente utilizados por la sencillez de su aplicación, con resultados que generalmente son preliminares a la implementación de las técnicas cuantitativas más complejas mencionadas (Bruneton, 2001).

IV.1.1.1. Fitoquímica de *Cestrum parqui* L'Her y relación con el poder antioxidante

Los extractos metanólicos de *C. parqui* obtenidos durante el trabajo experimental de esta tesis demostraron la presencia de flavonoides y taninos dentro del grupo de compuestos fenólicos, evidenciados mediante la reacción de Shinoda y el reactivo de FeCl₃, respectivamente. Para los taninos, además, se corroboró su presencia mediante la reacción con gelatina. En el caso de la prueba de Shinoda, de acuerdo con el patrón de colores obtenidos en los extractos metanólicos de *Cestrum parqui*, se corresponden con flavonoles o flavonololes (rosa pálido) o flavononas (color rosado) (Bonilla *et al.*, 2014). Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, se comprueba que ellos también corroboraron

la presencia de este grupo de compuestos (D'abrosca *et al.*, 2004; Rashed *et al.*, 2013). A los flavonoides se les atribuyen diferentes propiedades benéficas, tanto para el normal desarrollo de las plantas que los producen, como cuando son extraídos para ser utilizados en productos destinados a medicina humana. Estos principios activos otorgan a las plantas protección contra radiaciones UV (Wink, 2007) y participan en el proceso de polinización a través de especies de insectos que ven en el rango de dicha longitud de onda (Bourgauud *et al.*, 2001; Vivanco *et al.*, 2005).

Flavonoides y taninos participan en el secuestro de especies reactivas del oxígeno (ROS) uno de los principales factores asociados al desarrollo de ciertas enfermedades, y algunos trabajos mencionan que sus propiedades benéficas para la salud pueden atribuirse a dicha capacidad (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016; Bouarab-Chibane *et al.*, 2019). Al respecto, se ha comprobado la presencia de flavonoides en extractos metanólicos de *C. nocturnum* L. (Al-Reza *et al.*, 2013), algo similar a lo que ocurre con los extractos metanólicos de *C. parqui* estudiados en esta tesis. Los extractos vegetales que poseen compuestos fenólicos demuestran actividad antiinflamatoria (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016) y los obtenidos a partir de algunas especies de *Cestrum* sp. actúan además como antimicrobianos, impidiendo el crecimiento de microorganismos que constituyen la etiología de diferentes procesos infecciosos (Al-Reza *et al.*, 2013; Bouarab-Chibane *et al.*, 2019).

En ciertos países algunas especies del género *Cestrum* (incluida *C. parqui*) son consideradas plantas medicinales, pese a la reconocida capacidad tóxica que poseen, formando parte de la etnobotánica regional. En Chile, por ejemplo, *C. parqui* es utilizado para tratar procesos febriles e inflamatorios (Backhouse *et al.*, 1996) y en China *C. nocturnum* se utiliza para el tratamiento de quemaduras e hinchazones (Begum y Goyal, 2007). En todos los

casos se utilizan decocciones o extractos de hojas para aplicación dérmica, por lo cual los efectos tóxicos no tienen lugar al no haber ingestión ni metabolismo. Estas propiedades pueden atribuirse a los flavonoides presentes y a su capacidad como secuestrantes de ROS.

La prueba de la gelatina fue positiva para taninos, compuestos que también han sido evidenciados en otros trabajos de investigación (Chikkaswamy, 2015; El-Demerdash *et al.*, 2021) a través de técnicas cromatográficas complejas como GC-MS. Para de Sousa Araújo y col. 2008, existe una fuerte asociación entre el contenido de taninos en diferentes especies vegetales de Brasil usadas en etnobotánica, con los efectos atribuidos por diferentes comunidades de pueblos originarios a la capacidad de estas plantas para curar heridas y procesos inflamatorios.

Lípidos y glúcidos están presentes en nuestros extractos metanólicos de *Cestrum parqui*; Chikkaswamy y col. 2015, también mencionan su presencia. Los lípidos, conocidos además como “cuerpos grasos”, se clasifican en simples y complejos, y constituyen la fracción saponificable; también está presente una fracción insaponificable. Los simples son ésteres de ácidos grasos y un alcohol (glicerol, para triacilgliceroles; alcohol alifático de masa molecular elevada, para los céricos). En el caso de los complejos, están constituidos por fosfolípidos y glicolípidos. Los insaponificables están representados por esteroides, esteroides, terpenos y vitaminas, entre otros. Además de ser componentes estructurales y funcionales, son sustancias de reserva energética (Bruneton, 2001). Ramadan *et al.*, 2007, mencionan que ciertos componentes lipídicos presentes en semillas de algunos géneros de solanáceas poseen capacidad antioxidante; si bien en nuestro trabajo se utilizaron partes aéreas (hojas), es posible que estas biomoléculas también ejerzan este efecto cuando *C. parqui* se utiliza de manera tópica.

Para los glúcidos, los estudios disponibles mencionan que monosacáridos y disacáridos ejercen cierto efecto secuestrante de radicales libres *in vitro*, si bien mínimo; los polisacáridos, que sí lo demuestran, poseen esta capacidad gracias a los grupos fenólicos presentes o bien a sus asociaciones químicas a proteínas; en cualquiera de los casos la capacidad de “scavenging” resulta mínima al compararla con la de otras biomoléculas (Hu *et al.*, 2016).

Mediante la reacción de Liebermann-Burchard se evidenciaron compuestos esteroides, aunque no triterpenos bajo nuestras condiciones de trabajo. Algunos investigadores hallaron terpenoides en *C. parqui* (D’Abrosca *et al.*, 2005), aunque en dicho caso el solvente utilizado fue acetona. Estas diferencias con los resultados del trabajo experimental desarrollado en esta tesis pueden deberse al solvente seleccionado para la obtención de los extractos (metanol), y a los métodos cromatográficos cuantitativos utilizados en los otros estudios. Rashed 2013, menciona en su trabajo la capacidad antioxidante de un extracto de *C. nocturnum*, para el cual indica entre sus componentes con actividad secuestrante de ROS a los triterpenos, si bien no hace referencia a dicha capacidad como atribuible solo a éstos, sino a la presencia en conjunto de este grupo de compuestos y otros, incluidos flavonoides, saponinas y taninos. Los esteroides, por su parte, constituyen un grupo amplio de compuestos químicos con múltiples efectos en el desarrollo de las plantas. Los fitoesteroides son ubicuos en el reino vegetal y algunos de ellos poseen efectos farmacológicos, por ejemplo, capacidad hipocolesterolemica. Otros, como los withanólidos, son lactonas esteroidales que poseen varias actividades biológicas y los bassinoesteroides pueden actuar como promotores del crecimiento vegetal (Gunaherath y Guatilaka, 2014). Patel y Savjani 2015, mencionan que algunos esteroides presentes en las plantas podrían ejercer capacidad antiinflamatoria; químicamente estarían emparentados con los glucocorticoides utilizados en medicina, de allí esta propiedad

farmacológica; este efecto, sin embargo, no se relacionaría con el secuestro de ROS sino a su capacidad para inhibir la síntesis de citosinas que participan en dicho proceso.

No se hallaron antraquinonas mediante la reacción de Bornträger en nuestros extractos de *C. parqui*, compuestos que sí fueron identificados por otros investigadores en estudios fitoquímicos del “duraznillo negro” (Chikkaswamy y col, 2015); estas diferencias pueden atribuirse a los métodos de extracción y a los ensayos más complejos utilizados en dichos trabajos. Las antraquinonas poseen múltiples efectos sobre los seres vivos, pueden comportarse como antidiarreicos, antitusivos, antihelmínticos, analgésicos, además de ser agentes antimicrobianos y antiinflamatorios. Estas dos últimas propiedades se atribuyen a su capacidad para secuestrar ROS, particularmente $O_2^{\bullet -}$ en soluciones acuosas (Trung *et al.*, 2021).

En el caso de los alcaloides, evidenciados por el reactivo de Dragendorff en nuestros extractos, también fueron determinados por Begum y Goyal, 2007 para el género *Cestrum*. En varias especies de la familia de las solanáceas estos compuestos confieren a las plantas capacidad tóxica, hecho que se verifica en *C. parqui*; los efectos varían desde irritación leve hasta desenlaces fatales (por cardiotoxicidad y hepatotoxicidad). Un alcaloide común a varios géneros de la familia Solanaceae con capacidad tóxica es la solanina (Chikkaswamy, 2015).

No se encontraron leucoantocianinas en nuestros extractos, ausencia también comprobada por Stampella *et al.*, 2010 para el género *Cestrum*.

Silva *et al.*, 1962; Pomilio *et al.*, 2008; Bascope y Sterner., 2013, mencionan la presencia de cardenólidos en *Cestrum parqui*. Por el contrario, bajo las condiciones de trabajo utilizadas en esta tesis, estos compuestos no pudieron ser identificados con la reacción de Legal; estas diferencias pueden atribuirse a la menor sensibilidad de esta prueba, en contraste

con las metodologías más complejas utilizadas por los autores mencionados (GC-MS o HPLC). A pesar de esto, sí se comprobó la presencia de saponinas por un método cualitativo, la reacción de agitación con formación de espuma, la cual evidenció el poder afrógeno de estos compuestos. López *et al.*, 1985, plantean que las saponinas presentes en *C. parqui* (sapogeninas, gitogeninas, digitogeninas, tigogenina y gitoxigenina) se hallan en cercanía estructural con los cardenólidos, compuestos relacionados con la capacidad cardiotoxica de *C. parqui* y que inhiben la funcionalidad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$.

Considerando lo hasta aquí expuesto se puede destacar que, a pesar de sus reconocidas propiedades tóxicas para humanos y animales cuando es ingerida, *Cestrum parqui* tiene potencial para comportarse como especie medicinal por sus principios activos con capacidad secuestrante de ROS si sus extractos o preparaciones se aplican en forma local. Esto se encuentra en contraposición a lo planteado como parte de la hipótesis, en la cual inicialmente afirmamos que esta planta posee sustancias con capacidad prooxidante. Este hallazgo, que surge de los resultados de esta tesis, podría contribuir al conocimiento científico acerca de plantas presentes en la flora de nuestro país y que son parte de nuestra etnobotánica.

IV.1.1.2. Fitoquímica de *Pascalía glauca* Ortega y relación con el poder antioxidante

Para los extractos de *Pascalía glauca* la reacción de Shinoda y el reactivo de cloruro férrico pusieron en evidencia flavonoides y oxhidrilos fenólicos de taninos, respectivamente. También resultó positiva la prueba de la gelatina, que corroboró la presencia de taninos. De acuerdo con el patrón de colores obtenidos a partir de la prueba de Shinoda, en nuestros extractos metanólicos de “sunchillo” existen flavonoles o flavonololes (evidenciados por un color rosa pálido en la fase amílica) o flavononas (color rosado) (Bonilla *et al.*, 2014). Lakshmanan y Priya, 2017, también informan la presencia de estos compuestos en *P. glauca*.

En la bibliografía disponible existe escasa información referida a principios activos con capacidad secuestrante de ROS para *P. glauca*, sin embargo, existen datos acerca de otras asteráceas emparentadas del género *Sphagneticola*, anteriormente conocido como *Wedelia* [como ocurre con *P. glauca*, antes conocida como *Wedelia glauca* (Ortega) O. Hoffm. ex Hicken]. Sureshkumar *et al.*, 2006, demostró la capacidad analgésica de *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski [sin. *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.] en ratas Suizo Albino sometidas a la prueba de dolor sobre platina térmica y ácido acético, demostrando que el extracto metanólico de esta planta produce inhibición del dolor en ambas pruebas de manera dosis dependiente, sugiriendo dichos autores que esta capacidad se debe a la presencia en el extracto de flavonoides, entre otros compuestos, que ejercen efecto antiinflamatorio mediado por la inhibición de especies reactivas del oxígeno. Otros investigadores han estudiado la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski [sin. *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc], demostrando que al utilizar flores para su preparación los extractos tuvieron la mayor capacidad antioxidante (Jayakumar *et al.*, 2011). Los extractos acuosos de hojas y flores de *S. trilobata* también demuestran actividad secuestrante de ROS (Govindappa *et al.*, 2011). Resulta interesante comparar los resultados obtenidos por estos investigadores con los hallados en esta tesis, ya que hemos puesto en evidencia la presencia de flavonoides y otros compuestos con efecto antioxidante. Por otra parte, cabe mencionar que los estudios fitoquímicos sobre *P. glauca* son escasos, por lo que los datos obtenidos a partir de nuestros estudios experimentales podrían contribuir con futuras líneas de investigación sobre esta planta.

El “sunchillo” posee, además, capacidad alelopática, esto es, su crecimiento puede limitar (o en algunos casos promover) el de otras especies vegetales, convirtiéndola en algunos casos en la especie predominante en una determinada zona. El proceso implica la

liberación de un compuesto químico desde una planta que tiene efecto sobre otra de diferente especie, o bien sobre microorganismos (bacterias, virus, hongos). Estudios experimentales han demostrado que el extracto acuoso de las hojas del “yuyo sapo” es capaz de inhibir el crecimiento del tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y del rabanito (*Raphanus sativus* L.) y que este efecto es dosis dependiente (considerando extractos acuosos de hojas y rizomas) (Sobrero *et al.*, 2004). Los compuestos alelopáticos son de naturaleza química variada, considerando al grupo de polifenólicos se ha comprobado que inhiben la actividad de fitohormonas como las giberelinas, es el caso de los ácidos ferúlico, p-cumárico, vainílico y las cumarinas. Estos compuestos demuestran, además, capacidad secuestrante de ROS (de Kilic y Yesiloglu, 2013; Paiva *et al.*, 2013; Ignole *et al.*, 2021). El ácido absísico, hormona vegetal que se incrementa durante estrés hídrico, provoca el cierre de los estomas, y varios flavonoides tienen efecto antagónico sobre dicha hormona (Muller, 1966; Muller, 1970; Ballester, 1971). Considerando a los taninos, algunos también se comportan como alelopáticos, provocando una reducción en la actividad de las enzimas hidrolíticas como amilasa o fosfatasa ácida en endosperma de semillas de cebada (Blanco, 2006).

En nuestros extractos de *P. glauca* se hallaron lípidos (prueba del yodo bisublimado) y carbohidratos (fenol 5% y ácido sulfúrico concentrado), principios químicos también encontrados en la especie por Lakshmanan y Priya, 2017. Considerando al grupo de los lípidos la planta posee aceites esenciales, evidenciados por la fragancia particular que posee. Hernández y Arambarri (2019) demostraron su presencia a través del estudio de la anatomía foliar y de las inflorescencias. Según los autores, entre sus constituyentes se encuentran principalmente terpenos. La reacción de Liebermann-Burchard evidenció compuestos esteroides, aunque no triterpenos bajo nuestras condiciones de trabajo. Además de los

hallazgos de Hernández y Arambarri (2019), otros autores hallaron terpenoides en *P. glauca* utilizando el reactivo de Salkowski, si bien en un extracto acetónico (Lakshmanan y Priya, 2017). Estas diferencias con los resultados del trabajo experimental de esta tesis podrían explicarse considerando el solvente utilizado para la obtención de los extractos (metanol) y a los métodos cualitativos llevados a cabo para evidenciarlos. Los aceites esenciales de *P. glauca* poseen efecto repelente sobre nematodos (Rípodas *et al.*, 2018) y se ha mencionado que esta abundancia en aceites podría promover el uso del “sunchillo” como especie para el control de plagas agrícolas.

Otras especies relacionadas también poseen aceites esenciales, en dichas fracciones se ha demostrado capacidad antioxidante. Es el caso de *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski, cuyo aceite demostró capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de manera concentración dependiente en estudios sobre líneas celulares de cáncer de pulmón en ratones (Karumuri y Kasagana, 2012) y en ratas a las cuales se les indujo diabetes mediada por aloxano (Senthilkumar *et al* 2008). *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski [sin. *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc] es otra fuente de aceites esenciales con potencial antioxidante. Dai *et al* (2013) investigaron el efecto antioxidante del aceite de esta planta a través de la determinación de su capacidad para secuestrar radicales libres, demostrando que posee un efecto moderado.

En el desarrollo de la presente tesis no se procedió a la extracción ni fueron analizadas las propiedades del aceite esencial de *P. glauca*, a pesar de que esto fue planteado entre doctorando, director y codirector como propuesta adicional a lo originalmente estipulado en el plan de tesis. El motivo radica en que dicho estudio había sido programado para el transcurso del año 2020, actividad que debió suspenderse por la pandemia de Covid-19. Nos comprometemos en desarrollar esta parte en trabajos posteriores a la finalización de esta tesis

como estudios de posdoctorado, a la luz de los datos bibliográficos disponibles de especies emparentadas con el “sunchillo”, y a la escasez de bibliografía disponible sobre la capacidad antioxidante de su aceite esencial.

Como se mencionó anteriormente, *P. glauca* demostró la presencia de glúcidos bajo nuestras condiciones de trabajo. A pesar de que los glúcidos pueden resultar blanco de las especies reactivas del oxígeno, algunos poseen cierta capacidad antioxidante. Este efecto se comprueba con algunos hidratos de carbono que pueden secuestrar radicales $\bullet\text{OH}$, como es el caso de los disacáridos maltosa y sacarosa. Aunque con menor poder antioxidante si se los compara con el resto de los compuestos que poseen dicha capacidad, los disacáridos participarían en la propiedad antioxidante de diferentes extractos de plantas (Morelli *et al.*, 2003). Al consultar la bibliografía disponible no se pudieron encontrar citas acerca de la composición en glúcidos de *Pascalina glauca* (*ex. Wedelia glauca*), aunque sí se hallaron publicaciones sobre la determinación positiva de la presencia de estas biomoléculas en extractos de otras *Wedelia* sp. y especies relacionadas a través de reacciones químicas cualitativas, ensayos similares a los utilizados en nuestro trabajo experimental (Karumuri y Kasagana, 2012; Lakshmanan y Priya, 2017). No se hallaron antraquinonas mediante la reacción de Bornträger; en la bibliografía consultada tampoco se menciona su presencia (Lakshmanan y Priya, 2017). Los alcaloides de *P. glauca* fueron puestos en evidencia mediante el reactivo de Dragendorff, hallazgos que resultan similares a los obtenidos por Lakshmanan y Priya, 2017. De acuerdo con la bibliografía revisada se describe que los alcaloides pueden comportarse como antioxidantes o agentes prooxidantes dependiendo de las condiciones en las cuales se realiza la peroxidación (Macáková *et al.*, 2019). No se encontraron leucoantocianinas, ausencia también comprobada por los autores mencionados.

IV.1.2. Ensayos de peroxidación medidos por quimioluminiscencia

A partir de los resultados obtenidos en el trabajo experimental se pudo comprobar la capacidad antioxidante de los extractos de *C. parqui* y *P. glauca* de manera concentración dependiente, con el efecto antioxidante correspondiente con la máxima concentración de extracto analizado, evidenciado por la menor cantidad de cuentas por minuto en los ensayos de quimioluminiscencia. A la luz de estos datos, se dispone de evidencia suficiente para rechazar la primera de las hipótesis planteadas inicialmente, donde se menciona que los extractos de *C. parqui* y *P. glauca* poseen capacidad prooxidante capaz de provocar la peroxidación de membranas de microsomas y mitocondrias hepáticas, aumentando el estrés oxidativo de membranas biológicas en sistemas *in vitro*. Durante el planteo inicial de esta hipótesis se consideró que ambas plantas, por el hecho de poseer principios activos tóxicos entre los que se encuentran atractilósidos y compuestos cardiotoxicos (Bruneton, 2001; Canham *et al.*, 1950), poseerían capacidad para generar especies reactivas del oxígeno como un mecanismo de toxicidad. Dichos efectos, sin embargo, no se presentaron durante los ensayos de peroxidación, ya que no hubo disminución de las cuentas por minuto que indicara algún posible mecanismo de toxicidad. Es probable que esta ausencia de capacidad prooxidante, y efecto tóxico relacionado, se deba a que no ocurrió un proceso de metabolización que pudiera generar una cascada de eventos que condujera al daño, tal como ocurre en el organismo y debido principalmente al metabolismo que sufren estos xenobióticos (Chen y Chang, 2013; Carlier *et al.*, 2014; Cárdenas *et al.*, 2015). Los atractilósidos provocan profundos cambios negativos en el metabolismo de hígado y riñón, modificando la actividad enzimática de varias proteínas con actividad catalítica, efectos que se han demostrado en estudios *in vitro* en cortes de alta precisión de ambos órganos, lo que evidencia que requieren

de procesos metabólicos para ejercer su efecto tóxico (Georgiou *et al.*, 1988; Obatomi *et al.*, 1998; Daniele *et al.*, 2005).

En los ensayos de esta tesis ambos extractos demostraron poseer compuestos con capacidad antioxidante, algo que también se comprueba en trabajos de diferentes investigadores con otras solanáceas y asteráceas. Al comparar los resultados obtenidos en nuestro trabajo a partir de los extractos de la solanácea *C. parqui*, otros extractos de plantas de la misma familia demuestran propiedades similares. Por ejemplo, los obtenidos a partir de *Solanum melongena* (L.) de la India, disminuyen de manera significativa la producción de especies producto del daño oxidativo en membranas de hígado, riñón y corazón; las técnicas utilizadas para demostrar esta propiedad incluyen reacciones cuali/cuantitativas con malondialdehído (MDA) como especie reactiva al ácido tiobarbitúrico, metabolito final de la reacción de peroxidación de membranas biológicas; este efecto ha sido atribuido a los flavonoides que posee la planta (Sudheesh *et al.* 1999). En extractos de *Solanum ferrugineum* (Jasq) de México se demostró la propiedad antioxidante de sus extractos a través del método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), utilizado frecuentemente para determinar la capacidad antioxidante de jugos de frutas; en dicho trabajo los autores mencionan que el efecto podría deberse a la presencia de compuestos polifenólicos (Fernández-Rodríguez y Ruiz-López, 2021). *Solanum surattense* (Burm.fil), una solanácea utilizada como parte de la etnobotánica de la India, demuestra que sus extractos poseen capacidad antioxidante incluso más eficaz que otras sustancias como el alfa tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C), efecto puesto en evidencia a través del método DPPH (Muruham *et al.*, 2013). También mediante este último método, una especie presente en varios continentes, *Solanum nigrum* (L.), demuestra mediante ensayos realizados en modelos astrogiales que sus extractos son capaces de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a agentes estresantes

como el glutamato, por lo que reducen la producción de ROS, y tienen propiedades antioxidantes que pueden contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo (Campisi *et al.*, 2019). Y, para citar una especie de amplio uso, *Solanum lycopersicum* (Mill., “tomate”) contiene principios activos que intervienen en mecanismos de defensa *in vitro*, los cuales han demostrado actividad antioxidante (determinada por el método DPPH) similar o incluso de mayor eficacia que sistemas enzimáticos y no enzimáticos al ser enfrentados con agentes estresantes bióticos como parte de la profilaxis del desarrollo de esta especie (Zárate-Martínez *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta los hallazgos de esta tesis referidos a la capacidad antioxidante de los extractos de *P. glauca* ensayados, y considerando otras especies de Asteráceas, Krupanidhi *et al.* (2022), mencionan que el extracto de *Sonchus asper* (L.) exhibe actividad antioxidante *in vitro* (demostrada mediante el método DPPH) y que posee principios activos con capacidad quelante del hierro. Este metal (y otros, como el cobre o zinc) puede participar en reacciones de peroxidación, generando como productos ROS que pueden dañar las células y los tejidos. Por lo tanto, la actividad de estos quelantes resultaría beneficiosa al disminuir la disponibilidad de metales con efecto prooxidante, previniendo así la peroxidación e imposibilitando el estrés oxidativo. Los investigadores de este trabajo atribuyen estos efectos a la presencia de flavonoides, alcaloides y taninos, compuestos que también se encuentran en nuestros extractos de “sunchillo”. En otra asterácea, *Asteriscus maritimus* (L) del norte de África, Daroui-Mokaddem *et al.* (2016) cuantificaron fenoles totales en sus extractos mediante el método de Folin-Ciocalteu, Los investigadores hallaron que los extractos exhibían poder antioxidante al realizar la prueba de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo utilizando como metodología la resonancia del espín electrónico. En *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) se cuantificaron polifenoles y evidencia de poder antioxidante utilizando

métodos que determinan la capacidad de secuestro del radical DPPH (Fraisie *et al*, 2011), y en varias especies de *Artemisia* spp., recurriendo a la técnica del MDA, se hallaron resultados similares (Jamei & Anvari, 2017; Güneş *et al*, 2019). También se ha demostrado que *Vernonia condensata* Baker, muestra actividad antioxidante en sus extractos, determinada a través de MDA y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, indicando por lo tanto que contiene compuestos con propiedades antioxidantes (Barbosa de Silva *et al*, 2013; Zárata-Martínez *et al*, 2021).

Al analizar estas y otras citas bibliográficas disponibles, se comprueba que existen escasos estudios referidos específicamente a la composición de compuestos con poder antioxidante en *C. parqui* y *P. glauca*, a pesar de que en varios trabajos se menciona su posible presencia dado el uso etnobotánico de ambas plantas. Soto Núñez (2014) demuestra en su trabajo de tesina de graduación que el extracto hidroalcohólico de *C. parqui* posee capacidad antioxidante y surfactante en membranas de microsomas hepáticos y eritrocitos, respectivamente. Dicho investigador atribuye la capacidad secuestrante de ROS a la presencia de compuestos polifenólicos, determinada mediante la metodología de lipoperoxidación inducida por hierro/ascorbato y estimando la presencia de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para el caso de *P. glauca*, Hernández y Arambarri (2019) mencionan la presencia de saponinas, evidenciadas mediante los valores de la columna de espuma formada, de manera similar a lo realizado en esta tesis. Los autores también demuestran la presencia de resinas y aceites. En lo que se refiere al poder antioxidante de sus principios activos, no hallamos referencias específicas acerca de su fitoquímica y dicha propiedad, la cual algunos autores infieren a partir de estudios sobre la inhibición del crecimiento de diferentes microorganismos (Krishnavignesh y Mahalakshmi, 2017). Consideramos, por lo tanto, que los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis aportan nuevos datos a los disponibles, que tal vez puedan ser de utilidad para futuras líneas de investigación.

Analizando las diferencias en cuentas por minuto obtenidas por quimioluminiscencia para las diferentes concentraciones de extractos sobre membranas de microsomas y mitocondrias, se comprobó que existen diferencias entre ambas estructuras. Hemos hallado que el daño oxidativo y la peroxidación tienden a ser mayores en los microsomas en comparación con las mitocondrias. Esto podría deberse a la diferencia en la cantidad y eficacia de los sistemas antioxidantes presentes en cada una de estas estructuras. Como se ha mencionado anteriormente, el oxígeno es indispensable para la vida de los distintos organismos aerobios, aunque en ciertas concentraciones y en determinadas situaciones puede resultar tóxico (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005; Corrales y Muñoz Ariza, 2012). Los sistemas antioxidantes presentes en mitocondrias y microsomas presentan similitudes y diferencias a nivel estructural y funcional. En el caso de la mitocondria, la formación de especies reactivas del oxígeno es intensa debido a las vías metabólicas que allí ocurren tanto a nivel de la matriz (Ciclo de Krebs, catabolismo de proteínas, β -oxidación de los ácidos grasos) como en la membrana interna (cadena transportadora de electrones) (Blanco A y Blanco G, 2016; Stryer *et al.*, 2013; Feduchi *et al.*, 2021). Dichas ROS pueden generar estrés oxidativo en la célula si no se controlan adecuadamente, por lo que existe una cantidad sustancial de sistemas antioxidantes (Kuylenstiern *et al.*, 1969; Cook Sangar *et al.*, 2009; Brown y Borutaite, 2012). Aunque los microsomas también pueden generar especies reactivas del oxígeno debido a ciertas reacciones metabólicas, generalmente presentan una menor cantidad de sistemas antioxidantes. Esto se debe a que las funciones principales de los microsomas se centran en el metabolismo de lípidos, así como en la detoxificación de sustancias extrañas, incluidos fármacos y tóxicos.

Es importante destacar que la técnica de quimioluminiscencia utilizada en esta tesis, la cual permite detectar la emisión de fotones capaces de generar la ruptura de dobles enlaces en

diversas moléculas (ácidos grasos polinosaturados, polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas, aminoácidos y ácidos nucleicos), no ha sido utilizada previamente por otros investigadores para las especies vegetales estudiadas. Esta es una técnica utilizada desde hace tiempo en nuestro laboratorio, donde disponemos el equipo, que ofrece resultados rápidos y confiables. Si bien otras técnicas son más utilizadas en la actualidad, como MDA, la quimioluminiscencia continúa siendo una metodología precisa para la determinación del grado de peroxidación de diferentes biomoléculas. Mediante su implementación a través de esta tesis se realizan aportes al conocimiento acerca de las diferentes metodologías disponibles para la determinación del efecto antioxidante o prooxidante de diversas sustancias sometidas a investigación.

IV.1.3. Genotoxicidad

Los estudios de genotoxicidad realizados en este trabajo de tesis, que incluyeron el ensayo de micronúcleos y el ensayo cometa, evidencian que los extractos estudiados (bajo las concentraciones utilizadas) generan efectos genotóxicos dosis dependiente. Por lo tanto, estos hallazgos respaldan la segunda hipótesis, en la que se hace referencia a que los extractos de *C. parqui* y *P. glauca* presentan capacidad genotóxica.

Los ensayos de micronúcleos y cometa son utilizados en la evaluación de la genotoxicidad de sustancias químicas sobre las células (Fenech 2007; Collins 2004). Estas pruebas son herramientas importantes en la investigación toxicológica y se utilizan para determinar si una sustancia en particular puede causar daño en el material genético de las células. El ensayo de micronúcleos evalúa la presencia de pequeñas estructuras en el citoplasma de las células llamadas micronúcleos. Estos micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no lograron migrar adecuadamente durante la

división celular. Su presencia puede indicar daño en el material genético de las células y se considera un marcador de genotoxicidad. Por otro lado, el ensayo cometa permite evaluar el daño en el ADN a nivel individual. En este ensayo, las células se someten a lisis y electroforesis, lo que provoca que el ADN se desenrolle y forme una "cola" en forma de cometa. La longitud de la cola o el grado de migración del ADN fuera del núcleo se utiliza para cuantificar el daño en el ADN. Este ensayo es sensible para detectar daño citomolecular en el ADN de las células y puede proporcionar información sobre la genotoxicidad de una sustancia (Speit y Hartmann, 2006).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden tener efectos diversos, es decir, pueden dañar tanto la estructura de las células como el material genético. Su influencia sobre la genotoxicidad puede depender de la concentración, el tipo de metabolito y el sistema celular específico utilizado en los ensayos (Charzyńska *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2015).

Al considerar solanáceas cuyos extractos poseen actividad genotóxica, Alves dos Santos *et al.* (2008) demostraron que el extracto acuoso de *Physalis angulata* L. se comporta como genotóxico *in vitro* en linfocitos humanos; los autores mencionan que la planta es considerada medicinal en el norte de Brasil, sus extractos acuosos e infusiones son utilizadas para tratar la malaria, el asma, la hepatitis, la dermatitis y el reumatismo. Otra solanácea, conocida desde épocas remotas por sus propiedades farmacológicas y toxicologías, *Datura stramonium* L., *Sp. Pl.* ("estramonio"), posee capacidad citotóxica y genotóxica en sus extractos metanólicos también en linfocitos humanos; este efecto sería consecuencia de los alcaloides atropina y escopolamina presentes en altas concentraciones en semillas y frutos.

Por otra parte, diversos estudios sobre esta familia indican que los extractos no causan daño genotóxico en ciertas líneas celulares, y que por el contrario pueden tener efectos

protectores sobre la integridad nuclear. Considerando los datos obtenidos a partir del estudio fitoquímico de las plantas ensayadas en esta tesis, los efectos genotóxicos podrían atribuirse a los metabolitos secundarios presentes en *C. parqui* y concentradas durante la extracción realizada. Al respecto, Lira (2012) menciona la escasez de trabajos de investigación acerca de los efectos genotóxicos de extractos de *Cestrum parqui* en diferentes líneas celulares; por el contrario, sí existen estudios sobre algunas solanáceas emparentadas. Aguilar Santamarina *et al.* (2013) demostraron que el extracto hidroalcohólico de *Solanum chrysotrichum* (Schltdl) no presenta toxicidad bioquímica ni actividad genotóxica sobre líneas celulares de cáncer nasofaríngeo, aunque sí citotoxicidad (hepática y renal); los autores atribuyen esta característica a la presencia de saponinas. Otro extracto hidroalcohólico, en este caso de *Solanum lycocarpum* (A.St.-Hil.), fue inoculado a ratones y se encontró que no generó efectos genotóxicos en células de médula ósea murina; sin embargo, sí se demostró un aumento del efecto citotóxico en dosis altas (Vieira *et al.*, 2010). Otro estudio con esta especie demostró que el extracto hidroalcohólico genera una disminución significativa en las frecuencias de micronúcleos y daños en el ADN inducido por metanosulfonato de metilo en fibroblastos de pulmón de hámster chino, lo que sugiere un posible efecto protector o mitigador del extracto en respuesta a la exposición al agente carcinogénico (Andrade *et al.*, 2016). Los extractos hidroalcohólicos de *Solanum paniculatum* (L.) también han sido objeto de análisis en relación con la actividad biológica y en cuanto a su capacidad para proteger a las células contra actividades aneugénicas y clastogénicas; particularmente se evidenció que los alcaloides esteroidales presentes en los extractos generan una fuerte protección contra dichos efectos inducidos por mitomicina C, una sustancia conocida por su capacidad para dañar el ADN y provocar cambios cromosómicos. Además del efecto protector, también se demostró que los alcaloides esteroidales intervienen en la modulación de la citotoxicidad. Esto sugiere que

estos compuestos pueden tener propiedades que no solo protegen al ADN y los cromosomas de daños, sino que también influyen en la viabilidad y la integridad de las células (Vieira *et al.*, 2013).

También existen estudios similares para especies de la familia Asteraceae, a la cual pertenece *P. glauca*. Extractos a base de hexano y etanol de *Gimnosperma glutinosum* (Spreng) Less. ensayados con células mononucleares de sangre periférica demostraron genotoxicidad moderada ante el uso un diterpeno extraído (ácido ent-dihidrotucumanoico) (Alonso Castro *et al.*, 2019). Altamirano (2019) menciona la capacidad genotóxica de extractos de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze cuando se ensayan concentraciones elevadas. También formando parte de las asteráceas, el género *Senecio* posee efectos genotóxicos a través de sus extractos, tanto acuosos como preparados con otros solventes (Molyneux *et al.*, 2011). Esto se relaciona con los principios activos presentes en varias plantas del género, denominados alcaloides pirrolizidínicos (Macel 2010).

Por el contrario, los extractos de otras asteráceas han demostrado no poseer capacidad genotóxica. Es el caso de *Xanthium spinosum* (L), cuyos extractos acuosos y etanólicos no poseen dicha capacidad *in vitro* (Martins Güz *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Dunnick *et al.* en 2011, los extractos de *Silybum marianum* L. no generaron aberraciones cromosómicas ni formación de micronúcleos en cultivos de eritrocitos. Las aberraciones cromosómicas y la formación de micronúcleos son indicadores comunes de daño genotóxico en las células. La ausencia de estos efectos en los cultivos de eritrocitos tratados con extractos de *Silybum marianum* sugiere que no hay una alteración evidente en el material genético de las células evaluadas. De oliveira *et al.* 2013, utilizaron cultivos celulares de fibroblastos de pulmón de Hámster chino, los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones de artipilina C (ácido 3,5 diprenil-p-cumárico) del propóleo verde y de la Asteraceae *Baccharis*

dracunculifolia (DC) y metanosulfonato de metilo como agente control positivo en las pruebas de ensayo cometa y micronúcleos. Se observó que todas las concentraciones utilizadas de artipilina C mostraron actividad protectora en relación con la genotoxicidad inducida por el metanosulfonato de metilo.

Los estudios realizados y consultados en este trabajo de tesis mencionan y resaltan la importancia de evaluar cuidadosamente los efectos de los extractos de plantas y cómo estos pueden variar según la especie, las partes de la planta utilizadas en diferentes preparaciones (hojas, raíces, etc.), y los solventes empleados para extraer los compuestos, las concentraciones y cultivos celulares utilizadas. Esta información es esencial para comprender la seguridad y los posibles efectos terapéuticos de las plantas en diferentes contextos. Los resultados de esta tesis aportan al conocimiento con datos acerca de los efectos genotóxicos dosis dependiente para los extractos de *C. parqui* y *P. glauca* bajo nuestras condiciones de trabajo y podrán ser utilizados en futuras líneas de investigación propias y de otros equipos de trabajo.

IV.2. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral referido a los estudios de quimioluminiscencia realizados, se desprende que los extractos metanólicos de *Cestrum parqui* y *Pascalía glauca* de Argentina poseen capacidad antioxidante a las concentraciones utilizadas, atribuible a la presencia de compuestos polifenólicos como flavonoides y taninos. Estos hallazgos aportan datos que podrían explicar el uso etnobotánico extendido que tienen estas plantas en ciertas regiones geográficas.

Los estudios de genotoxicidad de ambas plantas realizados en este trabajo son equiparables a los realizados en ciertas especies vegetales emparentadas. Se demuestra que, bajo las condiciones de trabajo y en las concentraciones utilizadas, poseen capacidad genotóxica dosis dependiente.

Finalmente, la utilización de la quimioluminiscencia, técnica para la cual no existen precedentes acerca de su implementación para el estudio *in vitro* de la capacidad antioxidante de extractos de *C. parqui* y *P. glauca* resulta algo novedoso y que deseamos destacar. Este equipamiento forma parte vital dentro de los disponibles en el laboratorio de Bioquímica y, a la luz de los resultados de esta tesis, será utilizado en el futuro para nuevos trabajos sobre el posible efecto antioxidante o prooxidante de extractos vegetales.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. Afroz M, Akter S, Ahmed A, Rouf R, Shilpi JA, Tiralongo E, Sarker S, Göransson U, Uddin SJ. Ethnobotany and Antimicrobial Peptides From Plants of the Solanaceae Family: An Update and Future Prospects. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00565>
2. Aguilar Santamaría L, Ramírez G, Herrera Arellano A, Zamilpa A, Jiménez JE, Alonso Cortés D, Cortés Gutiérrez EI, Ledesma N, Tortoriello J. Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of ethnopharmacology*. 2007; 109 (1), 35–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.013>
3. Aguilar Santamaría L, Herrera Arellano A, Zamilpa A, Alonso Cortés D, Jiménez Ferrer E, Tortoriello J, Zúñiga González G. Toxicology, genotoxicity, and cytotoxicity of three extracts of *Solanum chrysotrichum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 150 2013; (1), 275–279.
4. Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Morgan D, Raaf M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 6^{ta} edición. Barcelona. Omega. 1350 pp. 2016. ISBN: 978-84-282-1638-8.
5. Albornoz A. Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela. 616 pp. 1980.
6. Allmann DW, Harris RA, Green DE. Site of action of atractyloside in mitochondria. II. Inhibition of oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys*. 1967 Dec; 122 (3): 766-782. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90186-5](https://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(67)90186-5).

7. Alonso MA, Cargnel E. *Wedelia glauca*. Reporte de un caso clínico en medicina veterinaria. Sitio Argentino de Producción Animal 2007; 21 (77): 31-34.
8. Alonso-Castro AJ, Arana-Argáez VE, Deveze-Alvarez MA, Chan-Zapata I, Torres-Romero JC, Carranza-Álvarez C, Luna-Rubio S, González-Chávez MM, Zapata-Morales JR, Aragón-Martínez OH, Ramírez-Morales MA. Anti-inflammatory and diuretic effects of the diterpene ent-dihydrotucumanoic acid. *Drug Dev Res.* 2019; 80 (6): 800-806. DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.21561>
9. Altamirano CG. Evaluación de la genotoxicidad y toxicidad general de extractos acuosos de *Acanthospermum australe* Loefl. Kuntze (Asteraceae) por medio del test de *Allium cepa*. *Dominguezia* 2019; 35 (2): 23-28.
10. Altamirano CG, Pozzer MJ, Rebatta JL, Semczuk RI, Florentín AP, Fernandez MS. Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) leaves using the *Allium cepa* test. *Revista Fitos.* Rio de Janeiro. 2020; 14 (1): 67-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.32712/2446-4775.2020.809>.
11. Al-Reza S, Rahman A, Cho Y, Kang SC. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *JEOP.* 2013; 13 (5): 615-624. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643871>
12. Alves dos Santos R, Cabral TR, Cabral IR, Antunes LM, Pontes Andrade C, Cerqueira dos Santos Cardoso P, de Oliveira Bahia M, Pessoa C, Martins do Nascimento JL, Rodríguez Burbano R, Takahashi CS. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocyte treated *in vitro*. *Biocell.* 2008; 32 (2): 195-200. PMID 18825913.

13. Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Heredia JB. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A review. *Cogent Food Agric.* 2016; 2 (1): 1131412. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1131412>
14. Andrade AF, Alves JM, Corrêa MB, Cunha WR, Veneziani RCS, Távare DC. *In vitro* cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity assessment of *Solanum lycocarpum* hydroalcoholic extract. *Pharmaceutical Biology.* 2016; 54 (11): 2786–2790. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1175022>
15. Araya O, González S. Intoxicación de caballos con *Senecio erraticus*. *Gac Vet Bs As.* 1979; 346: 743-745.
16. Asimakis GK, Sordahl LA. Effects of atractyloside and palmitoyl coenzyme A on calcium transport in cardiac mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1977; 179 (1): 200–210.
17. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry.* 2011; 72 (6): 435-457. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>.
18. Autino JC, Romanelli G, Ruiz DM. *Introducción a la química orgánica.* 1^{ra}. ed. Editorial UNLP. La Plata. 2013. Recuperado el 10 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/31664/AUTINO;jsessionid=164947A159E3434DDA2739C99A9FB884?sequence=1>.
19. Ávalos García P, Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal.* 2009; 2 (3): 119-145.

20. Avello Marcia y Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista médica de Chile*. 2010; 138 (10): 1288-1293. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010001100014>.
21. Azcón J, Talón M. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc. Graw Hill. Interamericana. Edicions Universitat de Barcelona. Madrid. 2008. 641 pp.
22. Bailac PN, Dellacasa AD, Ponzi MI, Firpo NH. Essential oil composition of *Wedelia glauca* (Ort) Hoffman ex Hicken from Argentina. *J Essent Oil Res*. 2005; 17: 401-402. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698942>.
23. Backhouse N, Delporte C, Negrete R, Salinas P, Pinto A, Aravena S, Cassels BK. Antiinflammatory and antipyretic activities of *Cuscuta chilensis*, *Cestrum parqui* and *Psoralea glandulosa*. *Pharm Biol*. 2018; 34 (1): 53-57. DOI: <https://doi.org/10.1076/phbi.34.1.53.13176>.
24. Ballester A. Estudio de sustancias de crecimiento aislados de *Erica cinerea* L. *Acta Cient Compostelana* .1971; 8 (2): 79-84.
25. Bandoni AL, Mendiondo ME, Rondina RVD, Coussio JD. Survey of argentine medicinal plants -Folklore and phytochemical- Screening. II. *Economic Botany*. 1976; 30 (2): 161-185. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02862962>.
26. Barboza GE, Cantero JJ, Nuñez C, Pacciaroni A, Ariza Espinar L. Medicinal Plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*. 2009; 34 (1-2): 7-365.
27. Barros CSL, Metzdorf L, Peixoto P. Ocorrência de surtos de intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras*. 1987; 7:101-107.
28. Bascope M, Sterner O. Phytochemical research of plants used by the association of traditional medicine at apillapampa. *Revista Boliviana de Química*. 2007; 24 (1): 14-

25. Recuperado el 02 de marzo de 2018. Disponible en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602007000100004&lng=es&tlng=.
29. Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J. *El mundo de la célula*. 6^{ta} edición. Madrid. Pearson S.A. 1008 pp. 2007. ISBN: 10:84-205-5013-2.
30. Begeres de Almeida M, Schild A, Assis Brasil N, Souza Quevedo P, Fiss L, Pfister J, Riet-Correa F. Conditioned aversion in sheep induced by *Baccharis coridifolia*. *Appl Ani Behaviour Sci*. 2009; 117: 197-200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.12.006>.
31. Begum AS, Goyal M. Research and medicinal potential of the genus *Cestrum* (Solanaceae) – A review. *Pharmacogn Rev*. 2007; 1 (2): 320-332.
32. Bermúdez A, Oliveira-Miranda MA, Velázquez D. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia* 2005; 30 (8): 453-459. Recuperado el 30 de marzo de 2019. Disponible en http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005
33. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*. 2014; 94 (2): 329-354. DOI: <https://dx.doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>.
34. Bhoola K. (1983). A clinico-pathological and biochemical study of the toxicity of *Callilepis Laureola* (“impila”). Thesis, University of Natal, Durban.
35. Blanco Y. La utilización de la aleopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos tropicales* 2006; 27 (3): 5-16.
36. Blanco A, Blanco G. *Química Biológica*. 10^{ma} edición. Buenos Aires: El Ateneo. 736 pp. 2016. ISBN: 978-950-02-1034-8.

37. Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Nitric Oxide. Methods Enzymol.* 1999; 301: 188-198. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)01082-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)01082-4).
38. Bonilla Ríos N, Varón F, Garzón L. Extracción de pigmentos colorantes tipo flavonoides, flor del pomo (*Syzygium Jambos*). Zona verde del IEAR. Florencia Caquetá. *Amazonia Investiga* 2014; 3 (5): 34-42. Recuperado el 28 de noviembre de 2018. Disponible en: <https://amazoniainvestiga.info/index.php/amazonia/article/view/669>
39. Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lantéri P, Clément Y, Léonard-Akkari L, Oulahal N, Degraeve P, Bordes C. Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) models. *Front Microbiol.* 2019; 10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>
40. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science.* 2001; 161 (5): 839–851. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3).
41. Brambilla G, Martelli A, Marinari UM. Is lipid peroxidation associated with DNA damage? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 1989; 214 (1): 123-127. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(89\)90205-4](https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90205-4).
42. Brown GC, Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion.* 2012; 12 (1): 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.02.001>.
43. Bruneton J. Plantas tóxicas. Vegetales peligrosos para el hombre y los animales. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 540 pp. 2001. ISBN: 84-200-0935-0

44. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978; 52: 302- 310.
45. Canham P, Warren F. Saponins II. Isolation of gitogenin and digitogenin from *Cestrum parqui*. *J S African Chem*. 1950; 3: 63-65.
46. Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 2005; 17 (2): 164-173.
47. Cárdenas PD, Sonawane PD, Heinig U, Bocobza SE, Burdman S, Aharoni A. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in Solanaceae steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry*. 2015 May; 113: 24-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.010>.
48. Carlier J, Romeuf L, Guitton G, Priez-Barallon C, Bévalot F, Fanton L, Gaillard Y. A validated method for quantifying atractyloside and carboxyatractyloside in blood by HPLC-HRMS/MS, a non-fatal case of intoxication with *Atractylis gummifera* L., *J Analytical Toxicol*. 2014; 38 (9): 619–627. DOI: <https://doi.org/10.1093/jat/bku078>.
49. Charzyńska M, Simeonova E, Sikora A, Mostowska A, Leśniewska J. Application of the comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2000; 69 (2): 101-107. DOI: <https://doi.org/10.5586/asbp.2000.012>.
50. Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 2006; 124 (4): 803-814. DOI: [10.1016/j.cell.2006.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008).
51. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 1993; 49 (3): 481-493. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>.

52. Chen L, Hu A, Chang C. The degradation mechanism of toxic atractylosides in herbal medicines by decoction. *Molecules*. 2013; 18 (2): 2018-2028. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18022018>.
53. Chen T, Mei N, Fu PP. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J App Toxicol*. 2020; 30 (3): 183-196. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.1504>.
54. Chikkaswamy BK. Antioxidant potential, antimicrobial activities and phytochemical screening in three species of *Cestrum*. *Int J Adv Res IT Eng*. 2015; 4 (3): 1-10.
55. Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD. Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res*. 2001 Jul 1; 478 (1-2): 89-96. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00123-3](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00123-3)
56. Collazo L, Riet-Correa F. Experimental intoxication of sheep with *Wedelia glauca*. *Vet. Hum. Toxicol* 1996; 38: 200-203.
57. Collins AR, Dusinská M, Horská A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol*. 2001; 48 (3): 611-4.
58. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 2004; 26 (3): 249–261.
59. Comporti M. Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Mol Aspects Med*. 1993; 14 (3): 199-207. DOI: [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(93\)90006-Y](https://doi.org/10.1016/0098-2997(93)90006-Y).
60. Condon RG, Schaefer EJ, Santoro M, Longley R Jr, Tsao YS, Zurawski SM, Liu Z. Development of a Chinese hamster ovary cell line for recombinant adenovirus-mediated gene expression. *Biotechnol Prog*. 2003; 19 (1): 137-143. DOI: <https://doi.org/10.1021/bp0200696>.
61. Cook Sangar M, Anandatheerthavarada HK, Tang W, Prabu SK, Martin MV, Dostalek M, Avadhani NG. Human liver mitochondrial cytochrome P450 2D6 - individual

- variations and implications in drug metabolism. *FEBS Journal*. 2009; 276 (13): 3440-3453. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07067.x>.
62. Corrales LC, Muñoz Ariza MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 2012; 10 (18): 213-225.
63. Cortés Cortés ME. Plantas medicinales chilenas: Desde el saber etnobotánico a los efectos terapéuticos y reacciones adversas. *Rev Med Chile*. 2019; 147: 673-676.
64. D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Monaco P, Oriano P, Temussi F. Structure elucidation and phytotoxicity of C13 nor-isoprenoids from *Cestrum parqui*. *Phytochemistry*. 2004; 65 (4): 497-505. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.018>.
65. D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Monaco P, Zarrelli A. Low molecular weight phenols from the bioactive aqueous fraction of *Cestrum parqui*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52 (13): 4101-4108. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf049847v>.
66. D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Monaco P, Natale A, Oriano P, Zarrelli A. Structural characterization of phytotoxic terpenoids from *Cestrum parqui*. *Phytochemistry*. 2005; 66 (22): 2681-2688. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.09.011>.
67. Dai J, Zhu L, Yang L, Qiu J. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. *EXCLI J*. 2013; 12: 479-490.
68. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2004; 24 (1): 55-99. DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.20006>.

69. Daniele C, Dahamna S, Firuzi O, Sekfali N, Saso L, Mazzanti G. *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97 (2): 175-181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.025>.
70. Datta D, Khuroo M, Mattocks A, Aikat B, Chhuttanni P. Herbal medicines and veno-occlusive disease in India. *Postgrad Med J.* 1978; 54: 511-515.
71. de Juan Herrero J, Fernández Jover E, Iborra Rodríguez FJ, Rivera Calvet J. *Biología celular. Conceptos esenciales.* 1^{ra}. edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 557 pp. 2022. ISBN: 978-84-9835-771-4
72. De Robertis EM, Hib J. *De Robertis-Biología celular y Molecular.* 16^a edición. Buenos Aires. Hipocrático. 476 pp. 2012. ISBN: 978-987-24255-9-3.
73. De Paiva LB, Goldbeck R, dos Santos WD, Squina FM. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *BJPS.* 2013; 49 (3): 395-411.
74. de Oliveira PF, Lima IM, Monteiro Neto Mde A, Bastos JK, da Silva Filho AA, Tavares DC. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of artepillin C in V79 cells by the comet and micronucleus assays. *Nutr. Cancer.* 2013; 65 (7): 1098-103. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.815233>
75. De Sousa Araújo TA, Leal Alencar N, Calvancanti de Amorim EL, de Albuquerque UP. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids content from de local knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 120 (1): 72-80.
76. De Souza GR, De-Oliveira, ACAX, Soares V, Chagas LF, Barbi NS, Paumgarten FJR, da Silva AJR. Chemical profile, liver protective effects and analgesic properties of a *Solanum paniculatum* leaf extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019; 110, 129–138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.036>

77. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000; 18 (6): 655-673. DOI: <https://dx.doi.org/10.1097/00004872-200018060-00002>.
78. Dell Vitto LA, Petenatti EM. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Segunda parte: otras plantas útiles y nocivas. *Multequina.* 2015; 24: 47-74.
79. Descazeaux J. Intoxication des ruminants par *Cestrum parqui*. *Comp.Rend Soc Biol.* 1930; 3:240-241.
80. Devasagayam TP, Boloor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys.* 2003; 40 (5): 300-308.
81. Di Paolo LA, Ancinas MD, Tassara F, Peralta LM, Hoyos L. Intoxicación natural con *Nerium oleander* en llamas (*Lama glama*) en un establecimiento de la Provincia de Buenos Aires. *Vet Arg.* 2010; XXVII (263): 1-11.
82. Di Pierro D, Tavazzi B, Lazzarino G, Galvano M, Bartolini M, Giardina B. Separation of representative lipid compounds of biological membranes and lipid derivatives from peroxidized polyunsaturated fatty acids by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Free Radic Res.* 1997; 26 (4): 307-317. DOI: <https://doi.org/10.3109/10715769709097810>.
83. Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* 2000; 51 (3): 415-439. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(99\)00294-5](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(99)00294-5)
84. Dunnick J K, Nyska A, Bishop JB, Bucher JR, Chhabra RS, Foster PM, Serbus DC. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of milk thistle extract (CAS No. 84604-20-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Studies). *National Toxicology Program technical report series.* 2011; (565): 1-177.

85. Duthie G, Morrice P. La capacidad antioxidante de los flavonoides en los microsomas hepáticos no se refleja en los efectos antioxidantes *in vivo*. *Medicina oxidativa y longevidad celular*. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/165127>
86. El-Demerdash MM, El-Sayed AS, Georg NM, Abou-Elnour A, Noiser H. Biosystematic studies of some Egyptian species of *Cestrum* (Solanaceae). *Molec Biol Rep*. 2021; 48: 4497-4515. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06471-1>
87. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2004; 58 (1): 39-46. Recuperado el 25 de octubre de 2016. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/user/institution/login?targetUrl=%2Fscience%2Farticle%2Fabs%2Fpii%2FS0753332203001914>.
88. Eren-Guzelgun B, Ince E, Gurer-Orhan H. *In vitro* antioxidant/prooxidant effects of combined use of flavonoids, *Nat Prod Res*. 2018; 32 (12):1 446-1450. DOI: [10.1080/14786419.2017.1346637](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1346637).
89. Fahmy NM, Al-Sayed E, El-Shazly M, Nasser Singab A. Alkaloids of genus *Erythrina*: An updated review. *Nat Prod Res*. 2020; 34 (13): 1891-1912. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1564300>.
90. Fakhri S, Abdian S, Zarneshan SN, Akkol EK, Farzaei MH, Sobarzo-Sánchez E. Targeting Mitochondria by Plant Secondary Metabolites: A Promising Strategy in Combating Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 22; 22 (22): 12570. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fijms222212570>
91. Fang J, Chen L, Wu L, LI W. Intra-cardiac remote ischemic post-conditioning attenuates ischemia-reperfusion injury in rats. *Scandi Cardiovasc J*. 2009; 43: 386-394. DOI: <https://doi.org/10.1080/14017430902866681>.

92. Fazzio LE, Costa EF, Mattioli GA, Idiart JR. Intoxicación natural por laurel de jardín (*Nerium oleander* L.) en bovinos. Descripción de un caso. *Rev Med Vet.* 2007; 88 (6): 261-265.
93. Feduchi Canosa E, Romero Magdalena C, Yáñez Conde E, García-Hoz Jiménez C. *Bioquímica: Conceptos esenciales*. 3^{ra}. edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 452 pp. 2021. ISBN: 978-84-9110-680-7
94. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutat Res.* 1986; 161: 193–198.
95. Fenech MF. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols.* 2007; 5: 1084-1104.
96. Fenech MF. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriones for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91: 1438S.
97. Fenton HJH. LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans.* 1894; 65 (0): 899–910. DOI: <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>.
98. Fernández Pazos C. Alerta: sunchillo (*Wedelia glauca*). *Rev Brangus.* 2010; 32: 66-72.
99. Forbes JM. Dietary awareness. *Appl Animal Behav Sci.* 1998; 57: 287-297.
100. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med.* 1994; 97 (3): S5–S13. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(94)90292-5).
101. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982; 47 (5): 412-426.
102. Fridovich Y. Superoxide dismutase. *Ann Rev Biochem.* 1975; 44: 147-159.

103. Fu PP, Xia Q, Lin Ge, Chou MW. Pyrrolizidine alkaloids – Genotoxicity, metabolism, enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Met Rev.* 2004; 36 (1): 1-55. DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/DMR-120028426>.
104. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 42810: 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
105. Georgiou M, Sianidon L, Hatzis T, Papadatos J, Kouselini SA. Hepatotoxicity due to *Atractylis gummifera*. *L Clin. Toxicol.* 1988; 26: 487-493.
106. Gomes J, Magalhaes A, Michel V, Amado IF, Aranha P, Ovesen RG, Hansen HCB, Gartner F, Reis CA, Touati E. *Pteridium aquilinum* and its ptaquiloside toxin induce DNA damage response in gastric epithelial cells, a link with gastric carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2012; 126 (1): 60-71. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr329>.
107. Goossens A, Häkkinen S, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau, M, Inzè D, Oksman-Caldentey K.-M. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 8595-8600.
108. Govindappa M, Naga S, Poojaski MN, Sadananda TS, Chandrappa CP, Gustavo S, Sharanappa P, Anil KNV. Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *J Med Plants Res.* 2011; 5: 5718-5729.
109. Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M, Conradt HS. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj J.* 1999; 16 (2): 81-97. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1026466408042>.

110. Granados-Sánchez D, Ruíz-Puga P, Barrera-Escorcia H. Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*. 2008; 14 (1): 51-64. Recuperado el 18 de abril de 2021. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-40182008000100009
111. Gunaherath K, Gunatilaka L. Plant steroids: Occurrence, biological significance and their analysis. In Book: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. RA Meyers (Ed.) 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9931>
112. Habermehl G, Martz W, Tokarnia C, Dobereiner J, Méndez M. Livestock poisoning in South America by species of the *Senecio* plant. *Toxicon*. 1988; 26: 275-286.
113. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992; 119 (6): 598-620.
114. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57 (5): 715S-724S. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>.
115. Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans*. 1996; 24 (4): 1023-1027. DOI: <https://doi.org/10.1042/bst0241023>.
116. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine* (3rd. Ed.). Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 1999
117. Harborne JB. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plants analysis*. 3rd. Ed., Chapman & Hall. London. Weinheim. New York. Tokio. Melbourne. Madras. 1998. ISBN: 0 412 57260 5 (HB) and 0 412 57270 2 (PB).

118. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002; 55: 534–543.
119. Hu S, Yin J, Nie S, Wang J, Phillips G, Xie M, Cui S. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities of carbohydrates. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*. 2016; 7 (2): 19-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2016.04.001>
120. Hulbert A. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theoret Biol*. 2005; 234: 277-288.
121. Hutchings A, Terblanche S. Observation on the use of some known and suspected toxic Lilliforae in Zulu and Xhosa medicine. *S Afr Med J*. 1989; 75: 62-69.
122. Ignole A, Kadam MP, Dalu AP, Kute SM. A review of the pharmacological characteristics of vanillic acid. *J Drug Derliv Therap*. 2021; 11 (2S): 200-204.
123. Jayakumar D, Mary SJ, Santhi RJ. Antioxidant and antimicrobial activities of *Wedelia trilobata* and *Morinda pubescens*. *Asian J Chem*. 2011; 23: 305-308.
124. Johansen H, Rasmussen LH, Olsen CE, Bruun Hansen HC. Rate of hydrolysis and degradation of the cyanogenic glycoside – dhurrin – in soil. *Chemosphere*. 2007; 67 (2): 259-266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.013>.
125. Jones DA, Takemoto D. Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16 (1): 48-62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.016>.
126. Kao FT, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1968; 60 (4): 1275-1281. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.60.4.1275>.

127. Karumuri SS, Kasagana VN. Evaluation of cardiotoxic activity of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. leaves. *Res J Pharmacog Phytochem*. 2012; 4: 262-266.
128. Katz ML, Parker KR, Handelman GJ, Bramel TL, Dratz EA. Effects of antioxidant nutrient deficiency on the retina and retinal pigment epithelium of albino rats: a light and electron microscopic study. *Exp Eye Res*. 1982; 34 (3): 339-369. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(82\)90082-3](https://doi.org/10.1016/0014-4835(82)90082-3).
129. Kensler TW, Trush MA. Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ Mutagen*. 1984; 6 (4): 593-616. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2860060412>.
130. Kilic I, Yesiloglu Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochim Acta A Mol*. 2013; 115: 719-724.
131. Kim SJ, Jeong HJ, Myung NY, Kim MC, Lee JH, So HS, Park RK, Kim HM, Um JY, Hong SH. The protective mechanism of antioxidants in cadmium-induced ototoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Environ Health Perspect*. 2008; 116 (7): 854-862. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.60.4.1275>.
132. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat Res*. 2003; 540: 153–163.
133. Klingenberg M, Appel M, Oelrichs P. Wedeloside, a powerful inhibitor and ligand of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *FEBS Letters*. 1985; 189: 245-249.
134. Klingenberg M. Structure-function of the ADP/ATP carrier. *Biochem Soc Trans*. 1992; 20 (3): 547-550. DOI: <https://doi.org/10.1042/bst0200547>.

135. Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tetishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* 2004; 37: 370-378.
136. Krishnavignesh L, Mahalakshmi Priya A. Antimicrobial efficacy of *Wedelia glauca* (Ortega) O. Hoffm. Ex Hicken and phytochemical analysis using gas chromatography – mass spectrometry. *Int J Pharm Bio Sci.* 2017; 8 (4): 21-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.22376/ijpbs.2017.8.4.b21-29>.
137. Krishnavignesh L, Mahalakshmi Priya A. Gas chromatography-mass spectrometry analysis and *in vitro* antimicrobial screening of *Wedelia Glauca* (Ortega) O. Hoffm. Ex Hicken. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017; 10: 109-114. DOI: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i11.20557>.
138. Kubo L, Kinst-Hori I, Nikei K, Soria F, Takasaki M, Calderon J, Céspedes C. Tyrosinase inhibitors from galls of *Rhus javanica* leaves and their effects on insects. *Z Naturforsch.* 2003; 58: 719-725. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2003-9-1022>.
139. Kudo K, Kelly WR, Oelrichs PB. Experimental poisoning of mice and sheep with *Cestrum parqui*. In Seawright AA, Hegarty MP, James LF, Keeler RF (eds.) *Plant Toxicology*. Queensland Poisonous Plants Committee, Brisbane. 1985; 540-553.
140. Kuylenstiern B, Hovmöller S, Ernster L, Nicholls DG. Effect of trypsin on mitochondrial and microsomal enzymes. *Eur J Biochem.* 1970; 12: 419-426. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00868.x>.
141. Lakshmanan K, Priya A M. Antimicrobial efficacy of *Wedelia glauca* (Ortega) O. Hoffm. Ex. Hicken and phytochemical analysis using gas chromatography – mass spectrometry. *Int J Pharm Bio Sci.* 2017; 8 (4): 21-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.22376/ijpbs.2017.8.4.b21-29>.

142. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
143. Lemaster J, Sowers A. Phosphate dependence and atractyloside inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*. 1979; 254: 1248-1251.
144. Lira R. Genotoxicidad y antigenotoxicidad de plantas de la altura en Bolivia. En MI Oyarzarzabal (Presidencia). *XV Congreso Latinoamericano de Genética, XVI Congreso Argentino de Genética, XLI Congreso de la Sociedad Genética de Chile, II Reunión Regional SAG-Litoral*. Rosario, Argentina, 28 al 31 de octubre de 2012.
145. Lisboa B. Characterization of A4-3-oxo-C₂₁-steroids on thin-layer chromatograms by in situ colour reactions. *J Chromatogr*. 1964; 16: 136-151.
146. Liskovsky IJ, Cosa MT. 2005. Anatomía comparativa de hoja y tallo en los representantes de Cestreae G. Don (Solanaceae) de Argentina. *Gayana Bot*. 2005; 62: 33-43.
147. Lock de Ugaz O. Análisis fotoquímico y metabolitos secundarios. En: *Manual de Fitoterapia*. Revisoras: Villar López M, Mesa Ramos M, Pimentel OG. Organización Panamericana de la Salud. Es Salud. Lima, Perú. ISBN 9972-785-34-3. 2001. OPS/PER/01,11. 41-43.
148. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*. 2007; 173 (3): 502–511. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005>.
149. López T, Odriozola E, Eyherabide JJ. *Toxicidad vegetal para el ganado. Patología, prevención y control*. CERBAS INTA EEA, 1991 Balcarce, Argentina. 56 pp.

150. Lopez TA, Spinelli R, Villar JA. Efectos de la dosificación de *Cestrum parqui* L'Herit en ovinos y bovinos. *Gaceta Veterinaria, Buenos Aires*. 1978; 40: 642-650.
151. Lopez TA, Keeler RF, Sharma RP, Shupe JL. Asociación de compuestos esteroídicos con la toxicidad de *Cestrum parqui* L'Heritier. *Veterinaria Argentina*. 1985; 2 (20): 935-941.
152. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
153. Luciani S, Martini N, Santi R. Effects of carboxyatractyloside, a structural analogue of atractyloside, on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Life Sci*. 1971; 10: 961-968. DOI: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(71\)90099-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(71)90099-3).
154. Macáková, K., Afonso, R., Saso, L., & Mladěnka, P. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019; 134, 429–444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.026>
155. Macel M. Atraer y disuadir: un papel dual para los alcaloides de pirrolizidina en las interacciones planta-insecto. *Fitoquímica. Rev*. 2011; 10:75–82. DOI <https://doi.org/10.1007%2Fs11101-010-9181-1>
156. McLennan MW, Kelly WR. *Cestrum parqui* (green cestrum) poisoning in cattle. *Aust Vet J*. 1984; 61: 289-291. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1984.tb06013.x>
157. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79 (10): 727–747.
158. Martins Gúez C, Pansera Waczuk E, Braccini Pereira K, Morini Querol MC, Teixeira Da Rocha JB, Souza de Oliveira LF. *In vivo* and *in vitro* genotoxicity studies

- of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. *Braz J Pharm Sci*. 2012; 48 (3): 461-467.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502012000300013>.
159. Martínez G, Romero C, Pen C, Villar M, Durando P. Etnobotánica participativa en escuelas rurales de la comuna paso viejo (departamento Cruz del Eje, Córdoba, Argentina). *Bonplandia*. 2016; 25 (2): 145-162. Recuperado el 17 de septiembre de 2018. Disponible en <https://www.jstor.org/stable/26413084>
160. Marzocca A. *Vademécum de malezas medicinales de la Argentina. Indígenas y exóticas*. Editorial Orientación Gráfica Editora. 1^{ra} Ed. 363 pp. 1997. ISBN: 987-9260-00-7
161. Méndez MC, Riet-Correa F. *Plantas Tóxicas e Micotoxicoses*. Edit. Universitaria. Laboratorio Regional de Diagnóstico. Facultad de Veterinaria – UFP_{EL}. Pelotas, Brasil. 2002. 112 pp.
162. Molyneux RJ, Gardner DL, Colegate SM, Edgar JA. Toxicidad de alcaloides de pirrolizidina en ganado: ¿Un paradigma para el envenenamiento humano? *Aditivo alimentario. contacto Parte A. Química. Anal. Expo Control. Evaluación de riesgos*. 2011; 28: 293–307. DOI <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.547519>
163. Montalgo Vargas VA. Evaluación del empleo y la permanencia del conocimiento de plantas medicinales por los pobladores del área rural altiplánica del departamento de La Paz. Tesina para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica. 2006. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Recuperado el 20 de febrero de 2015. Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/05/996931/evaluacion-del-empleo-y-la-permanencia-del-conocimiento-de-plan_grhciCW.pdf.

164. Morelli R, Russo-Volpe S, Novella B, Lo Scalzo R. Fenton-dependent damage to carbohydrates: Free radical scavenging activity of some simple sugars. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 7418-7425.
165. Morrison W, Smith L. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res.* 1964; 5: 600-608.
166. Mosesso P, Palitti F. The genetic toxicology of 6-mercaptopurine. *Mutat Res/Rev Genet.* 1993; 296 (3): 279-294. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(93\)90015-F](https://doi.org/10.1016/0165-1110(93)90015-F).
167. Muller CH. The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetational composition. *Bulletin of the Torrey Botanical Club.* 1966; 93: 332-351.
168. Muller CH. The role of allelopathy and the evolution of vegetation. En: *Biochemical Coevolution.* Oregon: Univ. Press. 1970; p 13-32.
169. Obatomi DK, Bach PH. Biochemistry and toxicology of the diterpenoid atractyloside. *Food Chem Toxicol.* 1998; 36 (4): 335-346. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(98\)00002-7](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(98)00002-7).
170. Obatomi DK, Thanh NTK, Brant S, Bach PH. The toxic mechanism and metabolic effect of atractyloside in precision-cut pig kidney and liver slices. *Arch. Toxicol.* 1998; 72: 524-530. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s002040050537>.
171. Odriozola E, Campero C, Casaro A, López T, Olivieri G, Melucci O. Pyrrolizidine alkaloidosis in Argentinean cattle caused by *Senecio selloi*. *Vet Hum Toxicol.* 1994; 36: 205-208.
172. Odriozola E. Intoxicación por plantas tóxicas en bovinos. Décimas Jornadas de Veterinarias de Corrientes. Publicación electrónica de la Facultad de Ciencias

- Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. 2005. Recuperado el 27 de abril de 2016. Disponible en <http://www.laboratoriollamas.com.ar/wp-content/uploads/2012/08/Intoxicacion-por-plantas-toxicas-en-bovinos-Odrizola.pdf>
173. Oelrichs PB, Pearce CM, Kudo K, Kelly WR. The isolation, structure elucidation and toxicity of the kaurene glycosides parquin and carboxyparquin in *Cestrum parqui*. Chapter 46 in Colegate SM, Dorling PR (eds.) *Plant-associated Toxins. Agricultural, Phytochemical & Ecological Aspects*. CAB International, Wallingford. 1994; 251-256.
174. Olive PL. The Comet Assay in Clinical Practice, *Acta Oncológica*. 1999; 38 (7): 839-844. DOI: <https://doi.org/10.1080/028418699432527>
175. Palacios A, Barberón J, Leaden P, Zeinstegeer, P. *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) possess antioxidant properties on Fe²⁺ -initiated peroxidation of rat brain microsomes. *ADMET & DMPK*. 2016; 4 (2): 91-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.5599/admet.4.2.251>
176. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 2009; 14 (1): 27-38. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2008.01447.x>.
177. Patel SS, Savjani JK. Systemic review of plants steroids as potential antiinflammatory agents: Current status and future persepectives. *J Phytopharmacol*. 2015; 4 (2): 121-125.
178. Pearce CM, Skelton NJ, Naylor S, Kanaan R, Kelland J, Oelrichs PB, Williams DH. Parquin and carboxyparquin, toxic kaurene glycosides from the shrub *Cestrum parqui*. *J Chemi Soc*. 1992; 1 (5): 593-600. DOI:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1992/p1/p19920000593#:~:text=https%3A//doi.org/10.1039/P19920000593>.

179. Pegel P. Coffee's link to cancer (Lett). *Chem Eng News*. 1981; 20:4.
180. Pérez-Alonso N, Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 2011; 11 (4): 195-211.
181. Pérez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Reports*. 2009; 61 (1): 67–75.
182. Pomilio AB, Falzoni EM, Vitale AA. Toxic chemical compounds of the Solanaceae. *Nat Prod Comm*. 2008; 3 (4): 593-628. DOI: <https://doi.org/10.1177%2F1934578X0800300420>.
183. Plattner H, Hentschel J. *Biología celular*. 4^{ta} edición. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 535 pp. 2014. ISBN: 978-84-9835-521-5.
184. Pryor WA. *The role of free radical reactions in biological systems*. In: *Free Radicals in Biology*, Volume I (W. A. Pryor, Ed.) pp. 1–49. Academic Press, New York. 1976.
185. Provenza F, Pfister J, Cheney C. Mechanisms of learning in diet selection with reference to phytotoxicosis in herbivores. *J Range Manage*. 1992; 45: 36-45.
186. Ramadan MF, Zayed R, El-Shamy H. Screening of bioactive lipids and radical scavenging potential of some Solanaceae plants. *Food Chemistry*. 2007; 103 (3): 885-890. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.040>
187. Rashed K. Investigation of antioxidant activity from *Cestrum nocturnum* L. stems and phytochemical content. *Reviews of Progress*. 2013; 1 (5): 1-6.

188. Rashed K, Chang CW, Wu LY, Peng WH. Hepatoprotective effect of *Cestrum parqui* aerial parts and phytochemical profile. *World J Pharm Sci.* 2013; 1 (2): 39-46.
189. Riet-Correa F, Schild AH, Mendez M del C, Pinkiero MH. Intoxicação por *Cestrum parqui* (Solanaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 1986; 6: 111-115.
190. Riet-correa F, Méndez MC, Schild A. *Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos.* Ed. Hemisferio Sul Do Brasil, Pelotas. 340 p. 1991. ISBN: 9974-556-77-5
191. Riet-Correa F, Schild AL, Méndez MC, Lemos RA, Borges JR. *Doenças de ruminantes e equinos.* 3ª Ed. Pallotti, Santa Maria (Brasil). 692 p. 2007. ISBN: 8585519606.
192. Rípodas JI, Garita S, Bernardo V, Ruscitti M, Arango MC, Hernández MP. Efecto de la aplicación *in vitro* de aceites esenciales sobre *Nacobbus aberrans* y *Paecilomyces lilacinus*. *Dominguezia.* 2018; 34: 112-113.
193. Rodríguez Armesto R, Peralta C, Zimmerman R, Ochoteco M, Repetto A, Picco EJ. Mortandad en bovinos atribuible a la ingestión de *Wedelia glauca*. *Vet Arg.* 2003; 200: 745-751.
194. Rudd JA, White CT. A plant poisonous to livestock (*Cestrum parqui*). *Qd Agric J.* 1933; 40: 143-144.
195. Ruffinengo SM, Eguaras I, Floris C, Faverin P, Bailac P, Ponzi M. LD₅₀ and repellent effects of essential oils from Argentinian wild species on *Varroa destructor*. *J Econ Entomol.* 2005; 98: 651-655.
196. Santi R. Potassium atractylate, a new inhibitor of the tricarboxylic acid cycle. *Nature.* 1958; 182 (4630): 257. DOI: <https://doi.org/10.1038/182257a0>.

197. Santos CL, Pourrut B, Ferreira de Oliveira JM. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Front genet.* 2015; 6: 216. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00216>.
198. Santos J, Riet-Correa F, Simões S, Barros C. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 2008; 28: 1-14.
199. Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *ARS.* 2006; 8 (3-4): 582–599. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.582>.
200. Scarpa GF, Anconatani LM. Etnobotánica histórica de las misiones franciscanas del este de Formosa II: Identificación y análisis inéditos y reelaboración integral de fuentes ya publicadas a partir de hallazgos documentales. *Dominguezia.* 2017; 33 (2): 37-79.
201. Schacterle GR, Pollack RL. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal Biochem.* 1973; 51 (2): 654-5. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90523-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90523-x)
202. Schneider WC. Biochemical constitution of mammalian mitochondria. *J Histochem Cytochem.* 1953; 1 (4): 212-33. DOI: <https://doi.org/10.1177/1.4.212>.
203. Schütt F, Aretz S, Auffarth GU, Kopitz J. Moderately reduced ATP levels promote oxidative stress and debilitate autophagic and phagocytic capacities in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53: 5354-5361.
204. Shilpa K, Varun K, Lakshmi BS. An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci.* 2010; 5: 222-247.

205. Senthilkumar R, Ahmedjohn S, Archunan G, Manoharan N. Antioxidant activity of *Wedelia chinensis* in alloxan induced diabetic rats *Pharmacol Online*. 2008; 2: 640-651.
206. Simic MG, Taylor KA Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. In: Simic MG, Taylor KA, Ward JF, von Sonntag C (eds). Oxygen radicals in biology and medicine. *Basic Life Sciences* 1988; 49. Springer, Boston, MA.
207. Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, Collinson PO, Kaski JC. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2003; 107 (19): 2403-2405. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000072764.18315.6b>.
208. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991; 91 (3): S31–S38. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2).
209. Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, *J Cell Biol*. 1998; 140:1307-1320.
210. Shimizu N, Shimuara T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei, *Mutat Res*. 2000; 448:81–90.
211. Silva M, Mancinelli P, Cheul M. Chemical study of *Cestrum parqui*. *J Pharm Sci*. 1962; 51: 289. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.2600510323>.
212. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar; 175 (1): 184-91. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

213. Slater TF. *Free Radical Mechanisms in Tissue Injury*. Pion Ltd, London. 283 pp. 1972.
214. Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1984; 105:283-293. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05036-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05036-9).
215. Skanderup Falkenberg S, Tarnow I, Guzman A, Mølgaard P, Toft Simonsen H. Mapuche herbal medicine inhibits blood platelet aggregation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/647620>.
216. Sobrero MT, Ochoa M del C, Chaila S. Potencial alelopático de *Wedelia glauca*: Efecto sobre especies hortícolas. *Planta Daninha, Viçosa-MG.* 2004; 22 (1): 71-75.
217. Soto Núñez HG. Caracterización de extractos hidroalcohólico y acuoso de *C. parqui* L'Herit (Palqui) respecto a su actividad antioxidante y surfactante. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Memoria para optar al título de farmacéutico. 2014. Consultado el 5/5/2023. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/129923>
218. Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* 2006; 314: 275-86. DOI <https://doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275>
219. Stampella P, Arenas PM, López A, Borrego S, Vivar I, Cabrera N. Plantas útiles en el control de insectos bibliófagos. En: Pochetino y cols. *Tradiciones & transformaciones en etnobotánica.* 2010; Z15: 423-427.
220. Stryer LL, Berg JM, Tymoczko JL. 2013. *Bioquímica con Aplicaciones clínicas.* Barcelona: Reverté. 1054 pp. ISBN: 978-84-291-7602-5.

221. Sudheesh S, Sandhya C, Sarah Koshy A, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytotherapy Research*. 1999; 13 (5): 393–396. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1573\(199908/09\)13:5%3C393::aid-ptr474%3E3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1573(199908/09)13:5%3C393::aid-ptr474%3E3.0.co;2-8)
222. Sureshkumar S, Sivakumar T, Chandrasekar MJN, Suresh B. Investigating the anti-inflammatory and analgesic activities of leaves of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. in standard experimental animal. *Iranian J Pharm Res*. 2006; 5: 123-129.
223. Suzuki S, Tohma S, Futakawa N, Higashimoto M, Takiguchi M, Sato M. Induction of hepatic metallothionein by mitochondrial oxidative stress in mice. *J Health Sci*. 2005; 51 (5): 533-537. DOI: <https://doi.org/10.1248/jhs.51.533>.
224. Taiz L, Zeiger E. 2006. *Fisiología vegetal*. Vols. 1 y 2. Casteilo de la Plana. Publicacions de la Universitat Jaurae. 320 y 656 pp. 2006 ISBN: 978-84-8021-599-2 (v. 1). 978-84-8021-600-S (v.2)
225. Tangen O, Jonsson J, Orrenius S. Isolation of rat liver microsomes by gel filtration. *Analyt Biochem*. 1973; 54 (2): 597-603. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90392-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90392-8).
226. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35 (3): 206-21. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::aid-em8%3E3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3%3C206::aid-em8%3E3.0.co;2-j)
227. Toda S. Inhibitory effects of aromatic herbs on lipid peroxidation and protein oxidative modification by copper. *Phytother Res*. 2003; 17: 546–548. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1316>.

228. Tokarnia CH, Dobereiner J, Silva MF. *Plantas tóxicas da amazonía a bovinos e outros herbívoros*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonía. Manaus, Amazonas. 95 pp. 1979.
229. Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto P. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon*. 2002; 40: 1635-1660.
230. Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV, Döbereiner J. *Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção*, Ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p. 154-156. 2012. ISBN: 978-85-8780-903-2.
231. Trung NQ, Thong NM, Cuong DH, Manh TD, Hoang LP, Hien NK, Nam PC, Quang DT, Mechler A, Vo QV. Radical scavenging activity of natural anthraquinones: A theoretical insight. *ACS Omega*. 2021; 6: 13391-133397.
232. Turchi M. Multiple effects of bracken fern under *in vivo* and *in vitro* conditions. *APJCP*. 2014; 15 (18): 7505-7513. DOI: <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.18.7505>.
233. Turgut M, Alhan CC, Giürgöze M, Kurt A, Doğan Y, Tekatli M. Caboxyatractyloside poisoning in humans. *Ann Trop Paediatr*. 2005; 25 (2): 125-134. DOI: <https://doi.org/10.1179/146532805X45728>.
234. Umegaki K, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*. 2000; 15 (3) 261–269.
235. Vaca CE, Wilhem J, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutat. Res*. 1988; 195: 137-149. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90022-x](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90022-x).

236. Vágufjalvi D. A new sensitive method of detecting alkaloids on a paper chromatogram with Dragendorff's reagent. *Planta Médica*. 1960; 8: 34-43.
237. Vieira PM, Marinho LP, Ferri SC, Chen-Chen L. Protective effects of steroidal alkaloids isolated from *Solanum paniculatum* L. against mitomycin cytotoxic and genotoxic actions. *An Acad Bras Cienc*. 2013; 85 (2): 553-60. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0001-37652013000200007>
238. Vignais PV, Vignais PM, Stanislas E. Action of potassium atractylate on oxidative phosphorylation in mitochondria and in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta* .1962; 60: 284-300. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90404-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90404-3).
239. Villar D. Factores que predisponen a la ingestión de plantas tóxicas por el ganado. *Revista CES/ Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2. Jul-Dic. 2007; Recuperado el 20 de mayo de 2018. Disponible en <https://imbiomed.com.mx/1/PDF/Co-Ve072-08.pdf>.
240. Vivanco JM, Cosio E, Loyola Vargas VM, Flores HE. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. Febrero 2005; 68-75.
241. Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv Lipid Res*. 1980; 17: 173-249.
242. Vökl A. Ultracentrifugation. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002969.pub2>.
243. Wink M. Bioprospecting: *The search for bioactive lead structures from nature*. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 97-116. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/9783527619771.ch6>.

244. Wolff SP, Dean RT. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochemical Journal*. 1986; 234 (2): 399-403. DOI: <https://dx.doi.org/10.1042%2Fbj2340399>.
245. Wright JR, Rumbaugh RC, Colby HD, Miles PR. The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1979; 192 (2): 344-351. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90102-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90102-4).
246. Zeynep UA, Gurkan S, Alpsoy L, Yildiz A. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of *Datura stramonium* extracts on cultured human lymphocytes. *Med Aromat Plants*. 2014; 3:170.
247. Zhang P, Li L, Sun H, Zhang Y, Zhang G, Zhang T, Zeng C. Mitochondrial energy-regulating effect of atractyloside inhibits hepatocellular steatosis through the activation of autophagy. *Front Pharmacol*. 2020; 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.575695>