



## **XXVIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**

Orden Poster: CM-023 (ID: 2590)

**Autor: Moro, Ramiro**

**Título: Citotoxicidad de extractos acuosos de Ipomoea carnea y su principal principio activo, swainsonina, sobre la línea celular tumoral C6**

Director: Bustillo, Soledad

Co-Director: Cholich, Luciana Andrea

Palabras clave: citotoxicidad, swainsonina, fluorescencia

Área de Beca: Cs. De La Salud

Tipo Beca: Cyt - Pregrado

Periodo: 01/03/2022 al 28/02/2023

Lugar de trabajo: Iquiba Nea - Inst. De Química Básica Y Aplicada Del Nordeste Argentino

Proyecto: (21F014) Evaluación de potenciales efectos farmacológicos y aplicaciones tecnológicas de compuestos derivados de la biomasa del Nordeste Argentino

### **Resumen:**

Los componentes bioactivos más importantes de *I. carnea* son las calisteginas (A3, B1, B2, B3 y C1) y la swainsonina (SW). Este último es un alcaloide que inhibe la acción de dos enzimas provocando una alteración en la degradación de los oligosacáridos y un procesamiento incompleto de las glicoproteínas. Las calisteginas también son alcaloides, las cuales son potentes inhibidores de la enzima glucosidasa. Se cree que ambos fitoconstituyentes son responsables de la enfermedad de almacenamiento lisosomal. Sin embargo, existe cierta controversia en la literatura con respecto a la participación de estos compuestos. Por un lado, se propone que las calisteginas no contribuyen a la toxicidad de *I. carnea* y, por otro lado, se demostró un síndrome neurológico asociado al consumo de plantas que no contenían swainsonina sino sólo calisteginas. Las lesiones histológicas inducidas por esta planta se caracterizan principalmente por la vacuolización de diferentes células, especialmente neuronas del sistema nervioso central. También se observó necrosis neuronal, formación de esferoides axonales y astrogliosis. En este sentido, se ha confirmado que el extracto alcaloidal de esta planta induce alteraciones morfológicas consistentes con activación glial y degeneración vacuolar en cultivos primarios de células gliales. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar y comparar la citotoxicidad de extractos acuosos de *I. carnea* y su principal principio activo, swainsonina, sobre la línea tumoral C6 y evaluar por fluorescencia los cambios morfológicos inducidos por los extractos acuosos y la swainsonina en las células gliales.

Para la obtención del extracto acuoso vegetal (EA) se maceraron hojas secas en etanol al 96%, tras la evaporación total a presión reducida a 50°C se suspendieron en agua para eliminar el residuo ceroso y se extrajo consecutivamente con éter sulfúrico, acetato de etilo y, por último, n-butanol. La solución acuosa fue liofilizada y almacenada a -20°C. Posteriormente se realizó la determinación de SW en el EA por cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) en el Poisonous Plants Research Laboratory (PPRL) (Utah, Estados Unidos). Por otro lado, la SW natural aislada de *Astragalus lentiginosus*, fue donada por el Dr. Dale Gardner del PPRL. Con la concentración de SW previamente definida por HPLC-MS/MS en el EA, se realizó el ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular C6 (ATCC: CCL-107™), correspondiente a un glioma maligno de murino, comparándola con la SW natural. Las células se expusieron a diferentes concentraciones de EA o SW natural (25- 1000 µM) y la viabilidad celular se determinó mediante tinción con cristal violeta. El porcentaje de viabilidad celular se determinó comparando las absorbancias resultantes con la absorbancia media de los pocillos de control. También se realizó un análisis morfológico con microscopía de fluorescencia, se utilizó la tinción dual fluorescente naranja de acridina/bromuro de etidio en las células cultivadas sobre cubreobjetos y tratadas con 300 µM de EA o 1000 µM de SW natural. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se adicionó una mezcla de los fluorocromos durante un minuto. Se aplicaron los cubreobjetos a los portaobjetos y las secciones se observaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia.

Los resultados evidenciaron una concentración de 1,6 µg de SW por miligramo y además se logró detectar la presencia de calisteginas. La citotoxicidad del EA sobre las células de la línea C6 se comparó con el efecto de la SW natural en cantidades equivalentes. Mientras que el EA mostró una citotoxicidad dosis-dependiente, ninguna de las dosis ensayadas de SW natural evidenció efectos sobre la viabilidad celular tras 48h de incubación. En cuanto a los cambios morfológicos analizados mediante microscopía de fluorescencia inducidos por el EA y la SW natural, las células de glioma no tratadas mostraban una fluorescencia verde, un núcleo claro con estructura intacta y presentaban cierta fluorescencia roja anaranjada punteada en el citoplasma homogéneamente distribuida que representa los lisosomas. En las células tratadas con 300 µM de EA tras 48 h de incubación se observaron células con fluorescencia rojo-anaranjada irregular en su periferia debido a la permeabilización por bromuro de etidio compatible con necrosis. Por otro lado, tras el tratamiento con 1000 µM de SW natural, las células mostraron un aumento del número de lisosomas presentes en el citoplasma sin evidenciar alteraciones en sus membranas celulares.

En conclusión, estos hallazgos demuestran que la swainsonina no sería el único componente presente en el extracto alcaloide de *I. carnea* responsable de la citotoxicidad in vitro en las células de glioma. Otros componentes, como las calisteginas, podrían contribuir

actuando sinérgicamente y desencadenando la muerte celular por necrosis. Por otra parte, SW es probablemente responsable de la astrogliosis por una posible disfunción lisosomal y por tanto del almacenamiento intracelular.