



XXVIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-028 (ID: 2616)

Autor: Cabrera Benitez, Angelica Maria

Título: Evaluación toxicológica in vitro del extracto enriquecido con alcaloides de Neltuma alpataco

Director: Cholich, Luciana Andrea

Co-Director: Pistan, María Elena

Palabras clave: vainas, alcaloides piperidínicos, citotoxicidad

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Cyt - Pregrado

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

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Veterinarias

Proyecto: (17B007) Estudios in vivo e in vitro sobre plantas neurotóxicas que afectan a los animales de producción del Norte Argentino.

Resumen:

Neltuma alpataco pertenece a la familia Fabaceae, vulgarmente es conocido como "Alpataco". Las vainas de Neltuma sp. se emplean como fuente de alimento para los animales de producción en distintas regiones del mundo debido a su valor nutricional. Se ha observado en el ganado signos clínicos del sistema nervioso que se asocian al consumo prolongado de vainas de diferentes especies de Neltuma. Sin embargo, no se ha investigado la composición química y evaluado la toxicidad in vitro de un extracto elaborado con vainas de P. alpataco. A partir de esto nos planteamos como objetivo para el presente trabajo caracterizar el contenido de alcaloides y la actividad neurotóxica in vitro de un extracto obtenido de vainas de N. alpataco. Para ello se utilizaron vainas de N. alpataco; las mismas se secaron a 37°C hasta obtener un peso constante y luego fueron pulverizadas con un molino. Mediante una extracción ácida/básica se obtuvieron extractos enriquecidos en alcaloides (EEA). Se realizó un análisis del EEA por HPLC-HRMS. Para los ensayos se usaron células de glioma C6 (ATCC:CCL-107™) y fueron cultivadas en matraces con Dulbecco's minimum essential medium (D-MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, Penicilina-Estreptomicina 1% mantenidas en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. La evaluación de las alteraciones morfológicas y el daño celular se investigaron en forma cualitativa utilizando un microscopio de contraste de fase de luz. Para evaluar el mecanismo de muerte celular desencadenado por el EEA de N. alpataco en células gliales se utilizó una tinción de fluorescencia dual con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE). Las células fueron cultivadas en cubreobjetos y tratadas con el EEA de N. alpataco (0 a 50 µg/mL) durante 48 h a 37°C. Las células de control fueron cultivadas utilizando PBS en lugar del extracto. Posterior a la incubación las células fueron lavadas dos veces con PBS y mezcladas suavemente con una mezcla de NA (1µg/mL) y solución de colorante de BE (1µg/mL) durante un minuto. Luego se colocaron en portaobjetos y observadas bajo un microscopio de fluorescencia. Los análisis por HPLC-HRMS del EEA arrojaron como resultado la presencia de alcaloides piperidínicos: Juliprosina y juliprosopina, presentes en otras sp. de Neltuma responsables de la toxicidad inducida en animales de laboratorio. En cuanto a la morfología celular las células no tratadas mostraron una distribución homogénea presentando una forma alargada y delgada. En cambio, en las células tratadas con concentraciones mayores a 10 µg/mL evidenciaron cambios morfológicos tales como redondeo de las células, presencia de pequeñas vacuolas citoplasmáticas, áreas

esprovisadas de células. Para determinar si el EEA de N. alpataco inducía alteraciones morfológicas atribuibles a un mecanismo apoptótico las células C6 se tiñeron con NA/BE. Las células no tratadas exhibieron una fluorescencia verde, núcleo verde claro con estructura intacta y presentaron una fluorescencia roja punteada en el citoplasma homogeneamente distribuida que representa a los lisosomas. Posterior a 48h de incubación con 30 µg/mL de EEA se observaron características típicas de apoptosis. Las células apoptóticas exhibieron un color verde brillante en el núcleo, áreas verdes densas y ampollas evidentes en su membrana y un aumento en el número de lisosomas evidenciados con color naranja. En conclusión podemos decir que en el presente trabajo se ha descrito por primera vez la presencia de alcaloides juliprosina y juliprosopina en las vainas de N. alpataco. Por otra parte, el presente estudio demostró el efecto citotóxico de EEA en células de glioma y se dilucidó el mecanismo molecular de estos efectos tóxicos desencadenados.