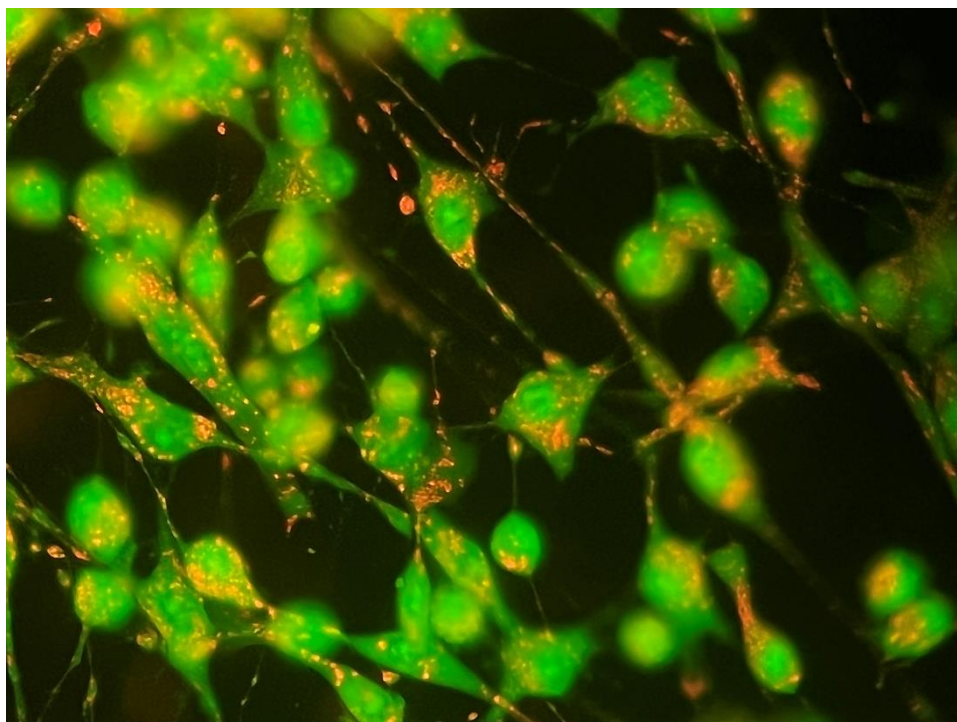


TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Licenciatura en Ciencias Biológicas



“Efectos sobre la adhesión y migración de células tumorales del extracto acuoso de *Ipomoea carnea* Jacq. y su principal principio activo, swainsonina”

Autor: Moro, Ramiro

Directora: Dra. Bustillo, Soledad

Codirectora: Dra. Cholich, Luciana

Lugar de trabajo: Grupo de Investigaciones Biológicas y Moleculares (GIByM) IQUIBA-NEA UNNE
CONICET / Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC) FaCENA-UNNE

Año: 2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia: mi mamá, Laura; mi papá, Aníbal; y mi hermana, Manuela, quienes son mis tres pilares fundamentales, sin los cuales no hubiera sido posible que me encuentre finalizando mi paso por la universidad. Agradezco su generosidad, acompañamiento, paciencia y, sobre todo, la constante fuente de amor y contención que me brindaron desde el inicio de mi formación académica.

A mis primas, Agostina y Oriana, les agradezco su apoyo incondicional a lo largo de este camino, así como su amistad y paciencia. Gracias por estar en los momentos en donde no veía salida y ser esa luz que ilumina el camino.

A mi novio, Facundo, por acompañarme durante todo el proceso de mi Trabajo Final y durante mis últimos años de la carrera, no hubieran sido lo mismo sin vos.

Especialmente agradezco a mi directora, Soledad, y a mi codirectora, Luciana, por haberme dado la posibilidad de llevar a cabo la beca de investigación de pregrado y mi Trabajo Final de Graduación bajo su tutela. Aprecio sus valiosos conocimientos y el tiempo que dedicaron para facilitar mis actividades. Su paciencia y dedicación para guiarme y enseñarme fueron fundamentales, yendo siempre más allá de lo necesario para formarme en este nuevo mundo al que estoy ingresando.

Al Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabInPro) a cargo de la Dra. Laura Leiva, a todos los investigadores y becarios, quienes me recibieron con apertura y disposición constante para ayudarme y orientarme. Al Grupo de Investigaciones Biológicas y Moleculares (GIByM), liderado por mi directora, la Dra. Soledad Bustillo, agradezco las herramientas y equipamientos esenciales que me proporcionaron para el desarrollo de este trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento al cuerpo docente de la asignatura Introducción a la Biología, en especial a la Dra. Lilia Mautino, al Dr. Federico Ruiz Díaz y a la profesora Fabiana Ramírez. Gracias por permitirme formar parte como adscripto y transmitirme su pasión y compromiso con la enseñanza.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mis compañeros y amigos que la carrera me brindó. En particular a Isis, Gusti, Romi, Tomi y Sol, les agradezco por acompañarme, guiarme, aguantarme y compartir innumerables horas de videollamadas y estudio, por hacer de estos años más llevaderos e inolvidables. Los momentos hermosos que compartimos son invaluable, y espero que podamos seguir construyendo juntos por muchos años más.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. <i>Ipomoea carnea</i> Jacq.	6
1.2. Principales compuestos bioactivos de <i>Ipomoea carnea</i> Jacq. y sus efectos biológicos.....	7
1.3. Cáncer y metástasis.	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo general.	9
2.2. Objetivos específicos.	9
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. <i>Ipomoea carnea</i> Jacq. Recolección e identificación taxonómica.	10
4.2. Swainsonina (SW).	10
4.3. Obtención de extracto alcaloidal de <i>Ipomoea carnea</i> Jacq. (EA).	10
4.4. Identificación de swainsonina en el EA por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS).....	10
4.5. Análisis cuantitativo de la swainsonina en el EA.	11
4.6. Cultivos celulares.....	11
4.6.1. Línea celular.	11
4.6.2. Mantenimiento y subcultivos.	11
4.7. Ensayos de citotoxicidad.	12
4.7.1. Citólisis.	12
4.7.2. Análisis morfológico celular por microscopía de fluorescencia.....	12
4.8. Inhibición de la adhesión de células tumorales.	12
4.9. Inhibición de la migración de células tumorales. Método de “Wound-healing”.	13
4.10. Análisis estadístico.....	13
5. RESULTADOS	13
5.1. Identificación y cuantificación de swainsonina en los extractos acuosos de <i>Ipomoea carnea</i> Jacq.	13
5.2. Ensayos de citotoxicidad.	14
5.3. Evaluación del potencial efecto antitumoral.	15
5.3.1. Inhibición de la adhesión celular.	15
5.3.2. Inhibición de la migración celular.	16
5.4. Análisis morfológico celular.....	17
6. DISCUSIÓN.....	17
7. CONCLUSIÓN	19
8. BIBLIOGRAFÍA.....	20

RESUMEN

Ipomoea carnea Jacq. contiene como componentes bioactivos principales a la swainsonina (SW) y las calisteginas (B1, B2, B3 y C1). Estos son alcaloides que inhiben la acción de dos enzimas provocando una alteración en la degradación de los oligosacáridos y un procesamiento incompleto de las glicoproteínas generando la denominada enfermedad de almacenamiento lisosomal. Sin embargo, a pesar de estos efectos toxicológicos, en las últimas décadas se ha investigado su potencial farmacológico o medicinal, demostrando tener actividades antimicrobianas, antioxidantes, antihiper glucémicas, inmunomoduladoras, sedativas e incluso disminuir la proliferación de células tumorales. En relación a esto último, es sabido que la enfermedad del cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial según la OMS. Afecta diversas partes del cuerpo y se caracteriza por la rápida proliferación de células anormales que pueden invadir tejidos circundantes y propagarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis. La adhesión y migración celular son etapas cruciales en este proceso, siendo objetivos críticos en la investigación oncológica para desarrollar terapias que los inhiban.

Es por eso que en este trabajo se estudiaron los potenciales efectos antitumorales *in vitro* de extractos acuosos (EA) de *Ipomoea carnea* Jacq. y su principal principio activo, la swainsonina, sobre una línea celular tumoral. Para ello se preparó en primer lugar un extracto alcaloidal a partir de ejemplares de *Ipomoea carnea* Jacq. Se identificaron los alcaloides mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) y luego se realizó un análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) para determinar la concentración de swainsonina en el extracto. Se estudió la actividad citotóxica de este extracto sobre la línea celular tumoral C6 de células gliales murinas evaluando la viabilidad celular, citólisis y cambios morfológicos inducidos mediante microscopía de contraste de fases y microscopía de fluorescencia. Por otro lado, se evaluó el efecto sobre la adhesión y migración celular utilizando concentraciones que demostraron ser no citotóxicas para las células.

Los resultados obtenidos indicaron que el EA de *I. carnea* Jacq. contenía 1.6 µg de SW por miligramo de extracto. Demostró tener un efecto citotóxico dosis-dependiente, disminuyendo la viabilidad celular de las células de la línea C6 en aproximadamente un 60% con una concentración de 250 µM. Además, se comprobó un efecto citolítico, debido al aumento de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante. Por el contrario, la swainsonina natural aislada de *Astragalus lentiginosus* Douglas, en concentraciones equivalentes a las del EA, no demostró ser citotóxica. Al evaluar el efecto sobre la adhesión de las células tumorales, el EA demostró tener un efecto inhibitorio directamente proporcional a las concentraciones ensayadas. A partir de una concentración de 50 µM, se observó una reducción significativa del 31% en la adhesión celular, alcanzando el máximo efecto con una dosis de 200 µM. Por otro lado, se evidenció que el EA fue capaz de reducir la migración celular en la línea tumoral C6, siendo más notable a una concentración de 50 µM, donde se registró una disminución en el recuento total de células migratorias en comparación con el control. En cuanto al análisis por tinción fluorescente, se observaron cambios morfológicos en las células C6 tratadas con EA compatibles con necrosis, evidenciada por la permeabilización celular, mientras que la SW aumentó el número de lisosomas sin afectar las membranas celulares.

En conclusión, el extracto alcaloidal de *Ipomoea carnea* Jacq. demostró un efecto citotóxico dosis-dependiente en células tumorales gliales C6, mientras que la swainsonina natural no afectó la viabilidad celular a concentraciones equivalentes. Esto sugiere que el alcaloide indólico SW no sería el único

responsable de la citotoxicidad, y que las calisteginas podrían contribuir sinérgicamente. Además, en concentraciones no citotóxicas, el extracto demostró inhibir la adhesión y migración celular, lo que sugiere un potencial efecto antitumoral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Ipomoea carnea* Jacq.

Ipomoea carnea Jacq., perteneciente a la familia Convolvulaceae, es una planta de hábito arbustivo, perenne y de hasta 3 m de alto, presenta un tallo grueso y sólido que se convierte en tronco de donde salen muchas ramas desde la base. Presenta flores con forma acampanada de color rosa pálido, frutos con una cápsula glabra y semillas sedosas. Las hojas son verdes, de forma lanceolada de longitud de entre 10-25 cm (Chiarini y Ariza Espinar, 2006) (Fig. 1).

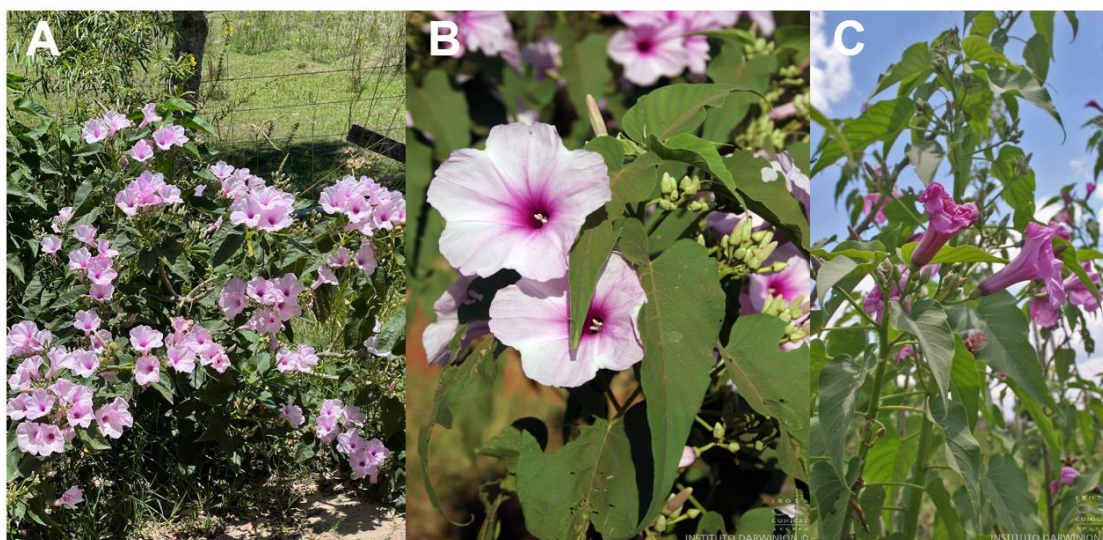


Figura 1. *Ipomoea carnea* Jacq. (A) Fotografía tomada por Bustillo, Soledad. (B y C) Fotografías extraídas del Instituto de Botánica Darwinion (IBODA-CONICET-ANCEFN).

En nuestra zona se la conoce con el nombre vulgar de “Mandiyurá” o “Aguapeí”, y se la puede encontrar fácilmente creciendo a lo largo de pastizales húmedos (Haase, 1999). En cuanto a su distribución, en nuestro país se encuentra ampliamente distribuida, encontrándose en las provincias de Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe y Tucumán. Así como también se encuentra distribuida en Brasil y Paraguay (Fig. 2), aunque también hay registros de esta en América del Norte, América Central y Asia (Flora Argentina, s.f.).

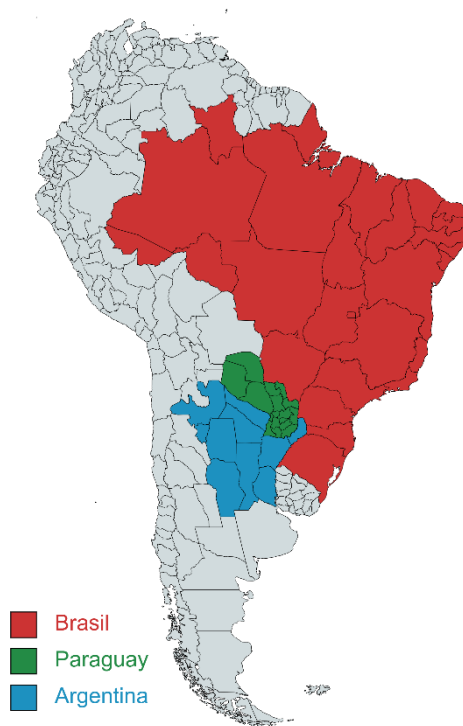


Figura 2. Distribución de *Ipomoea carnea* Jacq. según información extraída de <http://www.floraargentina.edu.ar/>.

1.2. Principales compuestos bioactivos de *Ipomoea carnea* Jacq. y sus efectos biológicos.

Muchas especies dentro del género *Ipomoea* presentan compuestos con actividades antimicrobianas, analgésicas, espasmolíticas, espasmogénicas, hipotensoras, psicotomiméticas y anticancerígenas. Los principales compuestos biológicamente activos de estas plantas son: alcaloides indólicos, tropánicos y ergolínicos; compuestos fenólicos; cumarinas; flavonoides; antocianósidos; glicolípidos; lignanos y triterpenos (Meira *et al.*, 2012).

Particularmente, en *I. carnea* Jacq. se han identificado alcaloides indólicos: la 2-epi-lentiginosina y la swainsonina; y alcaloides tropánicos: las calisteginas B1, B2, B3 y C1 (Fig. 3) (Haraguchi *et al.*, 2003).

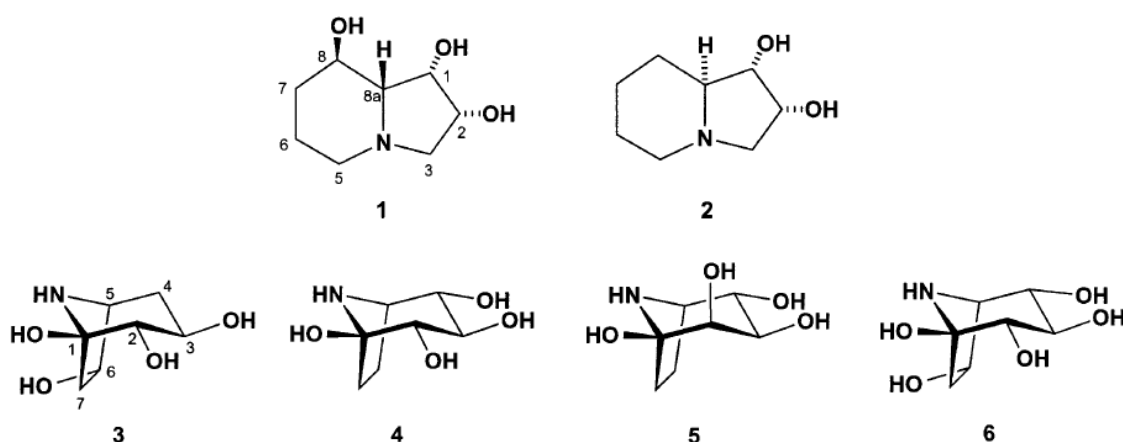


Figura 3. Estructuras químicas de los alcaloides aislados de *Ipomoea carnea* Jacq. Swainsonina (1), 2-epi-lentiginosina (2), Calistegina B1 (3), Calistegina B2 (4), Calistegina B3 (5) y Calistegina C1 (6). (Haraguchi *et al.*, 2003).

La swainsonina actúa como un potente inhibidor de las enzimas: α -manosidasa lisosomal, α -manosidasa II asociada al complejo de Golgi y la α -manosidasa citosólica, provocando una alteración en la degradación de los oligosacáridos y un procesamiento incompleto de las glicoproteínas (Haraguchi *et al.*, 2003; Malm y Nilssen, 2008). Esto ocurre debido a que la swainsonina tiene similitudes con la manosa, un monosacárido simple, al cual parece imitar (Dorling *et al.*, 1978). Además, cuando este alcaloide ingresa al lisosoma, eleva el pH de este debido a que es una base débil, lo que altera la actividad de otras enzimas lisosomales (Tulsiani y Touster, 1983). Por otro lado, Asano *et al.*, (1995) y de Balogh *et al.*, (1999) demostraron que las calisteginas también son potentes inhibidores de las enzimas glicosidasas. Debido a esto, se produce una disfunción enzimática y acumulación de oligosacáridos procesados incompletamente dentro de los lisosomas, ocasionando vacuolización (Armién *et al.*, 2007). Por esta razón se cree que ambos fitoconstituyentes son los responsables de generar la enfermedad de almacenamiento lisosomal conocida como mannosidosis.

El consumo y la exposición crónica a este vegetal provocan intoxicación en los rumiantes, especialmente en los caprinos. La toxicosis se caracteriza por la vacuolización lisosomal de diferentes órganos y se presenta clínicamente a través de manifestaciones relacionadas con el deterioro del sistema nervioso central tales como ataxia, temblores, postura anormal y pérdida de equilibrio (Armién *et al.*, 2007).

Una estrategia significativa en la búsqueda de nuevos fármacos activos es uno de los principales objetivos en la investigación biotecnológica e implica explorar compuestos derivados de la extracción y/o purificación de toxinas o metabolitos secundarios de diversas fuentes, como los microorganismos, animales y plantas. En este sentido, se han registrado más de 85.000 especies de plantas en la medicina tradicional a nivel global. Entre estos compuestos de origen vegetal, y específicamente con propiedades anticancerígenas, los alcaloides y los terpenoides destacan como categorías principales (Gupta *et al.*, 2005).

Es por ello que, en las últimas décadas, se ha estudiado el potencial medicinal o farmacológico asociado a *I. carnea* Jacq. y sus principales componentes bioactivos. Así, los extractos cetónicos y acuosos de esta planta han evidenciado poseer actividad antimicrobiana (Adsul *et al.*, 2012), antioxidante (Ambiga y Jeyaraj, 2015), anti hiperglucemiante, inmunomodulador, sedativo, entre otros (Fatima *et al.*, 2018). Extractos alcohólicos de *I. carnea* Jacq. y flavonoides aislados de la misma, lograron inhibir la migración celular en modelos *in vivo* e *in vitro* (Ambiga *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2018). Además, se ha evidenciado que su principal principio activo, la swainsonina, induce apoptosis en células tumorales esofágicas (Li *et al.*, 2012).

1.3. Cáncer y metástasis.

El término "cáncer" hace referencia a un amplio conjunto de enfermedades que tienen la capacidad de afectar cualquier parte del organismo. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 10 millones de defunciones atribuidas a esta enfermedad en el año 2023, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2023). Un rasgo característico del cáncer es la rápida proliferación de células anómalas, las cuales se expanden más allá de sus límites normales y tienen la capacidad de invadir áreas vecinas del cuerpo o diseminarse a otros órganos. Este proceso,

conocido como "metástasis" (NIH, 2023), implica la diseminación de células cancerosas desde el tumor original, o tumor primario, a través de la sangre o el sistema linfático y la formación de un tumor nuevo en otros órganos o tejidos, siendo el factor principal de mortalidad de esta enfermedad (Andrade Carvalho *et al.*, 2013).

Durante este proceso, las células metastásicas atraviesan etapas fundamentales: desprendimiento, migración, adhesión y fijación (Lee *et al.*, 2003). Además, se promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos para respaldar el crecimiento de los tumores, un proceso llamado angiogénesis. La comprensión de los cambios que convierten una célula normal en una célula cancerosa ha impulsado el desarrollo de terapias innovadoras dirigidas a tratar genes cruciales o rutas biológicas específicas (Calderon *et al.*, 2014).

La adhesión celular es la capacidad de una célula para unirse a otra célula o a la matriz extracelular. Desempeña un papel esencial en la comunicación y regulación de las células, teniendo una importancia fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos, participa en la regulación de la diferenciación celular, el ciclo celular, así como también en la migración y supervivencia celular. Cualquier cambio que se produzca en este fenómeno puede provocar una amplia variedad de enfermedades, incluida el cáncer (Khalili y Ahmad, 2015).

Las moléculas involucradas en la adhesión celular pueden agruparse en dos categorías: las que participan en la unión de la célula a la matriz extracelular y las que establecen uniones entre células contiguas. Las integrinas son una gran familia de proteínas transmembrana, presentes en la gran mayoría de los animales y son las principales proteínas encargadas de las uniones de las células a la matriz extracelular. Por otro lado, las moléculas que participan en la adhesión entre células pueden agruparse en cuatro categorías: cadherinas, inmunoglobulinas, selectinas y ciertos tipos de integrinas (Luo *et al.*, 2007).

Según Hiroshi y Kenai (2003), los cambios en la adhesividad celular pueden estar relacionados con el potencial invasivo y metastásico de las células cancerígenas.

Como se mencionó anteriormente, la letalidad del cáncer en los pacientes se debe en gran medida a la naturaleza migratoria de sus células. De hecho, se ha establecido sólidamente que la migración celular desempeña un papel crucial en la propagación, la infiltración de los tejidos y la formación de metástasis (Debeir *et al.*, 2008). Por lo tanto, es esencial entender los mecanismos biológicos subyacentes a la migración de las células cancerosas y desarrollar medicamentos que frenen este proceso, lo cual representa una necesidad imperante en el campo de la oncología.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Estudiar los potenciales efectos farmacológicos *in vitro* de extractos acuosos de *Ipomoea carnea* Jacq. y su principal principio activo, swainsonina, sobre células tumorales.

2.2. Objetivos específicos.

- Determinar la citotoxicidad de extractos acuosos de *I. carnea* Jacq. y su principal principio activo, swainsonina, sobre la línea tumoral C6 (glioma).

- Estudiar el efecto de extractos acuosos de *I. carnea* Jacq. y su principal principio activo, swainsonina, sobre la adhesión de células gliales de la línea celular C6.
- Evaluar la migración de las células tumorales en presencia de extractos acuosos de *I. carnea* Jacq. y su principal principio activo, swainsonina.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El extracto acuoso de *Ipomoea carnea* Jacq. y su principal principio activo, swainsonina, poseen un efecto inhibitorio sobre la adhesión y migración de células tumorales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. *Ipomoea carnea* Jacq. Recolección e identificación taxonómica.

Las muestras de *Ipomoea carnea* Jacq. fueron recolectadas en la Ciudad de Corrientes, Corrientes, Argentina para posteriormente ser identificadas y procesadas en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE-CONICET). Así mismo, un espécimen de muestra fue depositado en el Herbario CTES perteneciente al IBONE (UNNE-CONICET).

4.2. Swainsonina (SW).

La swainsonina natural (SW) de *Astragalus lentiginosus* Douglas fue aislada y donada por el Dr. Dale Gardner del Poisonous Plants Research Laboratory (PPRL) de Logan, Utah, Estados Unidos. Se utilizó como patrón del principio activo de la planta.

4.3. Obtención de extracto alcaloidal de *Ipomoea carnea* Jacq. (EA).

Se obtuvo el extracto de *I. carnea* Jacq. enriquecido en componentes alcaloides de la planta siguiendo el método descrito por Hueza *et al.* (2003). Brevemente, hojas secas (200 g) se maceraron en etanol al 96% (2 L). Después de la evaporación total del solvente bajo presión reducida a 50 °C, se obtuvo un extracto verde oscuro, que se suspendió en agua para eliminar el residuo ceroso y posteriormente se extrajo sucesivamente con éter dietílico, acetato de etilo y finalmente n-butanol Merck (Darmstadt, Alemania) saturado con agua. La solución acuosa se liofilizó para obtener un extracto enriquecido en alcaloides, que se denominó EA y se almacenó a -20°C.

4.4. Identificación de swainsonina en el EA por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS).

El extracto de *Ipomoea carnea* Jacq. se disolvió en 0.500 mL de ácido acético al 2%. Luego, se agregó una alícuota de 0.5 mL de la solución ácida a una columna de SPE preparada (Strata X-C; 30 mg, Phenomenex), que se lavó con agua (2 mL), metanol (2 mL) y luego los compuestos de interés se eluyeron con metanol amoniacal (3 mL). El extracto alcaloideo se evaporó hasta sequedad y se silsiló con 200 µL de piridina y 50 µL de reactivo BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con trimetilclorosilano; Sigma-Aldrich, Co.) a 60 °C durante 30 minutos. Las muestras se diluyeron con 800 µL de cloroformo y luego se

analizaron por GC-MS para determinar la presencia de swainsonina (Gardner *et al.*, 2001). Esta determinación se realizó en colaboración con el Poisonous Plants Research Laboratory (PPRL) de Logan, Utah, Estados Unidos.

4.5. Análisis cuantitativo de la swainsonina en el EA.

Para cuantificar el contenido de swainsonina (Peso Molecular: 173.21) en el EA, se disolvieron 15 mg del extracto de *Ipomoea carnea* Jacq. en 1.0 mL de metanol. Se tomó una alícuota de 0.100 mL y se mezcló con 0.100 mL de ácido acético al 2%. Posteriormente, se diluyó esta alícuota con 0.900 mL de acetato de amonio 20 mM. La solución final se colocó en un vial autosample de 1.5 mL y se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) siguiendo los métodos previamente publicados por Gardner *et al.* (2001). Esta determinación se realizó en colaboración con el Poisonous Plants Research Laboratory (PPRL) de Logan, Utah, Estados Unidos.

4.6. Cultivos celulares.

4.6.1. Línea celular.

Se trabajó con la línea celular C6 (ATCC: CCL-107™), la cual proviene de un glioma maligno de murino, *Rattus norvegicus*. Tipo celular: células gliales tumorales (Fig. 4).

4.6.2. Mantenimiento y subcultivos.

Las células se mantuvieron en Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen), con el agregado de 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (GIBCO-Invitrogen), L-Glutamina (29,2 mg/ml), Penicilina (10000 unidades/ml) y Estreptomicina (10000 µg/ml) (GIBCO-Invitrogen) como antibióticos.

El subcultivo celular permitió controlar la densidad del inóculo inicial que asegura que se trabajó en condiciones de crecimiento óptimas. Para ello, se eliminó el medio de cultivo y se cubrió la monocapa con cantidad suficiente de Tripsina-EDTA 0.25% (GIBCO-Invitrogen) y se incubó durante 3-5 minutos a 37°C. Una vez que la monocapa se despegó, se agregó suero fetal bovino para inactivar la enzima. Luego del recuento celular con azul de tripan, entre 0,5 - 1x10⁵ cél/mL se sembraron en placas o frascos estériles rotulando: línea, pasaje, medio y fecha correspondientes. Se incubó a 37 °C y 5% de CO₂.

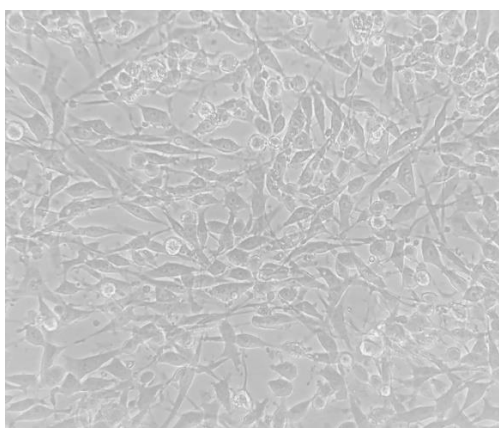


Figura 4. Microscopía de Contraste de Fases de la Línea Celular C6 (ATCC: CCL-107™).

4.7. Ensayos de citotoxicidad.

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron las células obtenidas de monocapas subconfluentes. Las células re suspendidas se sembraron en placas de 96 pocillos, $1.5\text{-}2.5 \times 10^4$ células por pocillo, en el mismo medio de crecimiento (DMEM-SFB 10%). Cuando la monocapa alcanzó un 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Ipomoea carnea* Jacq. o swainsonina equivalentes (25-1000 μM) diluidas en el medio de cultivo suplementado con 10% de SFB fueron adicionados a las células en cultivo (200 μL /pocillo). Se incubó 48h a 37°C y 5% de CO_2 en atmósfera húmeda y la viabilidad celular fue determinada por tinción con el colorante Cristal Violeta. La citotoxicidad fue evaluada por comparación de las absorbancias resultantes de los pocillos con extractos acuosos/swainsonina, con la absorbancia promedio de los pocillos utilizados como control (sin tratamiento, considerados como 100% de viabilidad) y fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular. Los experimentos se realizaron por triplicado (Bustillo *et al.*, 2012).

4.7.1. Citólisis.

Se cuantificó la actividad de la enzima citosólica Lactato Deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo luego de los tiempos de incubación correspondientes. Para ello, se recogieron alícuotas del sobrenadante de los pocillos de cultivo y se determinó la actividad LDH utilizando un kit comercial (Wiener, LDH-P UV). La citólisis se expresó como el porcentaje de liberación de LDH al medio. Los controles de referencia para el 0% y el 100% de citólisis consistieron en medio solo y medio de células incubadas con 0,1% (v/v) de Triton X-100, respectivamente (Bustillo *et al.*, 2012).

4.7.2. Análisis morfológico celular por microscopía de fluorescencia.

Se realizó una tinción dual fluorescente con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE) en células cultivadas sobre cubreobjetos y tratadas con 300 μM del extracto acuoso o 1000 μM de swainsonina natural (concentraciones que demostraron tener efecto citotóxico) durante 48h a 37°C. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS) y se adicionó una mezcla de naranja de acridina (NA) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y bromuro de etidio (BE) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante un minuto. Se lavó nuevamente con PBS y se aplicaron los cubreobjetos a los portaobjetos y las secciones se observaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Axioskop 40®/Axioskop 40 FL®, Carl Zeiss).

4.8. Inhibición de la adhesión de células tumorales.

Se utilizó una modificación de la técnica descrita por Paludo *et al.*, (2006). Brevemente, placas de 96 pocillos se cubrieron con 200 μL /pocillo de una mezcla de SFB:PBS (1:4) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego los pocillos se bloquearon con albumina sérica bovina (ASB) (Sigma) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 1 h a temperatura ambiente y luego se eliminó el excedente. Previamente, se incubó una mezcla (1:1) de suspensión de células de la línea C6 ($2.5\text{-}3 \times 10^4$ cél/mL, DMEM-SFB 10%) y del extracto acuoso de *Ipomoea carnea* Jacq. (50 μM , 100 μM y 200 μM , concentraciones no citotóxicas definidas previamente) durante 30 minutos a 37°C. Estas mezclas fueron sembradas en placas de 96 pocillos (100 μL /pocillo) y se incubaron 90 min a 37°C y 5% de CO_2 . Se eliminaron las células no adheridas por lavado con PBS y

se evaluó la adhesión utilizando el método de Cristal violeta. Se consideró como 100% de adherencia a los ensayos en los que las células se incuban solo con el medio de cultivo (Paludo *et al.*, 2006).

4.9. Inhibición de la migración de células tumorales. Método de “Wound-healing”.

Se cultivaron las células tumorales de la línea C6 en placas de 6 pocillos (1×10^6 cél/well). Una vez obtenida la monocapa celular, se realizó una herida con la punta de un tip estéril y se adicionaron diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Ipomoea carnea* Jacq. (25 μ M y 50 μ M, concentraciones no citotóxicas previamente definidas). Luego se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. La migración celular hacia la superficie de la herida fue determinada bajo un microscopio invertido. Se realizaron registros fotográficos y se cuantificaron las células en la herida mediante el software ImageJ con el complemento “Cell Counter”.

4.10. Análisis estadístico.

Cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados de las diferentes determinaciones se expresaron como la media $\pm$ DE. Las diferencias entre grupos se valoraron mediante ANOVA univariado (One Way ANOVA) de una vía, seguido por la Prueba de Tuckey (HSD) utilizando el software Statistix (Version 3.5). Se consideró un valor estadísticamente significativo a $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación y cuantificación de swainsonina en los extractos acuosos de *Ipomoea carnea* Jacq.

Swainsonina y otros alcaloides denominados calisteginas B1, B2, B3 y C1 fueron identificadas en el extracto alcaloidal de *I. carnea* Jacq. mediante GC-MS (Fig. 5). La concentración de swainsonina fue de 1.6 μ g/mg en el extracto alcaloidal de *I. carnea* Jacq. según lo determinado por HPLC-MS/MS.

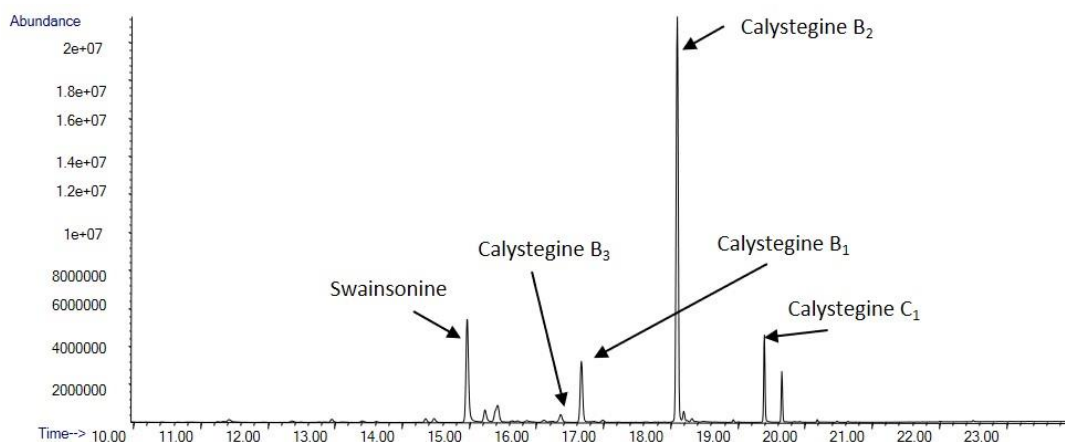


Figura 5. Identificación de swainsonina por GC-MS en el extracto alcaloidal de *Ipomoea carnea* Jacq.

5.2. Ensayos de citotoxicidad.

La citotoxicidad del extracto acuoso de *Ipomoea carnea* Jacq. sobre las células de la línea C6 se comparó con el efecto de la swainsonina natural (SW) de *Astragalus lentiginosus* Douglas en cantidades equivalentes según lo establecido previamente por HPLC-MS/MS. Mientras que el extracto mostró una citotoxicidad dosis-dependiente, ninguna de las dosis ensayadas de SW evidenció efectos sobre la viabilidad celular luego de 48h de incubación (Fig. 6).

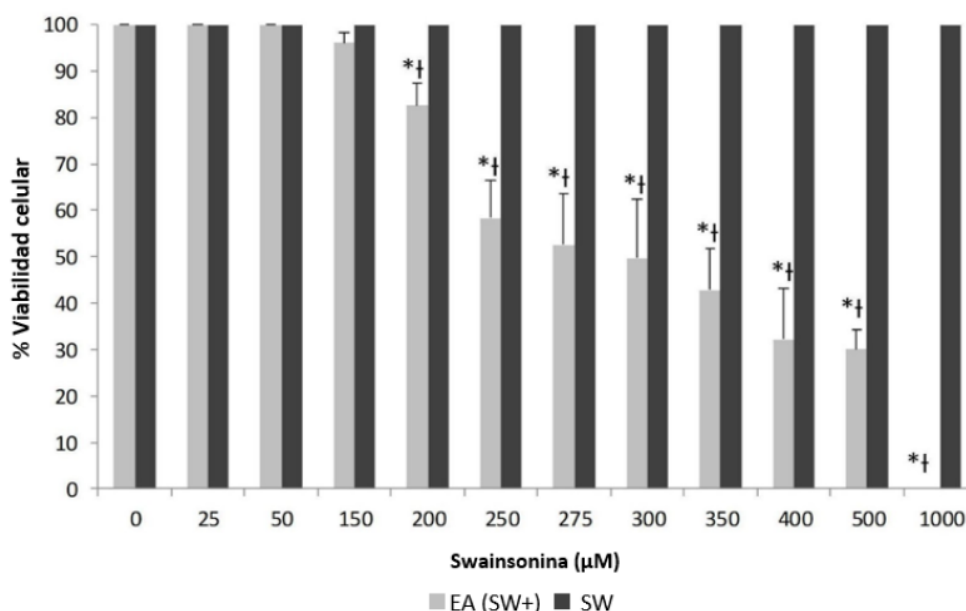


Figura 6. Actividad citotóxica del extracto acuoso (EA) de *Ipomoea carnea* Jacq. y swainsonina (SW) (25-1000 µM) sobre células de glioma C6 (48h). Cada columna representa la media $\pm$ DE (n=3), * p < 0,05 vs Control, † p < 0,05 EA vs SW.

Además, la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio, indicativa de daño en la membrana de las células gliales, fue proporcional a las concentraciones del extracto acuoso (200-1000 µM) y significativamente diferente a los controles y a los ensayos con swainsonina, incluso a la concentración más baja ensayada (200 µM) (Fig. 7).

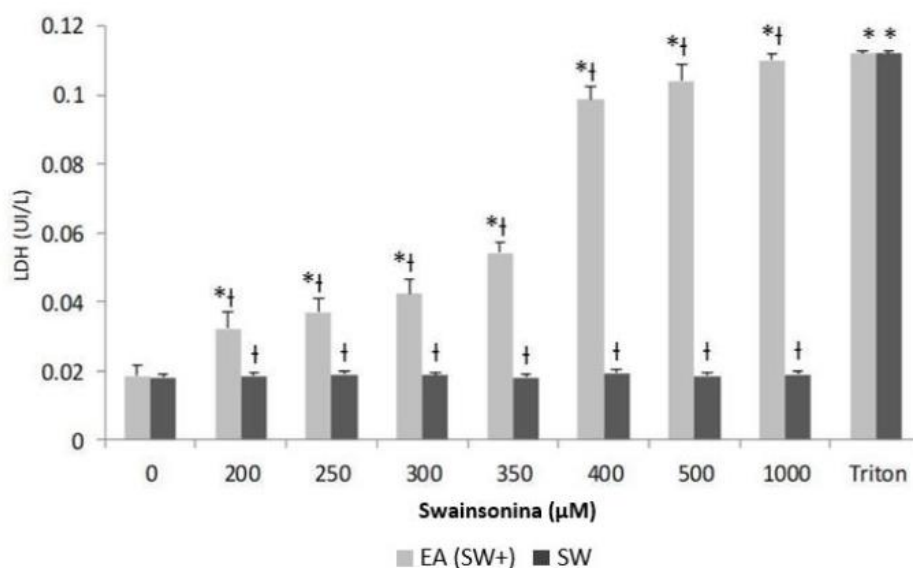


Figura 7. Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) tras la incubación de células de glioma con extracto acuoso (EA) de *Ipomoea carnea* Jacq. o swainsonina (SW) (200-1000 µM) durante 48h. Cada columna representa la media $\pm$ DE (n=3), * p < 0,05 vs Control, † p < 0,05 EA vs SW.

5.3. Evaluación del potencial efecto antitumoral.

5.3.1. Inhibición de la adhesión celular.

El extracto acuoso de *Ipomoea carnea* Jacq. inhibió la adhesión de las células tumorales de forma directamente proporcional a las concentraciones ensayadas. El efecto fue evidente a partir de concentraciones de 50 µM, inhibiendo aproximadamente un 31% este proceso celular con la máxima dosis ensayada (200µM) (Fig. 8).

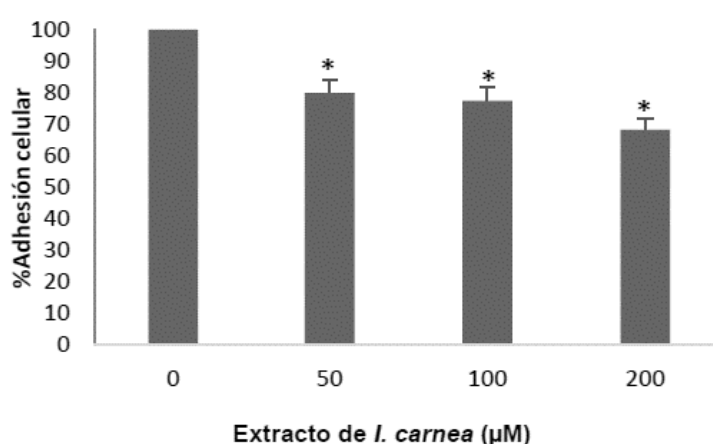


Figura 8. Efecto inhibitorio del extracto de *Ipomoea carnea* Jacq. sobre la adhesión de células de la línea tumoral C6. Las barras representan el promedio $\pm$ DE (n=3). *p<0.05 versus control.

5.3.2. Inhibición de la migración celular.

La inhibición de la migración celular se evaluó mediante el ensayo de cierre de la herida ("Wound healing" / "Wound migration") y se procedió a cuantificar las células en la herida utilizando el software ImageJ con el complemento "Cell Counter". Luego de 24 horas de incubación, en el ensayo control se registraron 318 células que migraron a la herida realizada (Fig.9B). Sin embargo, al exponer las células a una concentración de 50 μM del extracto alcaloidal de *Ipomoea carnea* Jacq., se observó una reducción en la migración de las células tumorales de la línea C6, con un recuento total de 238 células (Fig. 9D). No se detectaron diferencias significativas con respecto al control luego de la incubación con 25 μM del extracto alcaloidal (302 células) (Fig. 9C).

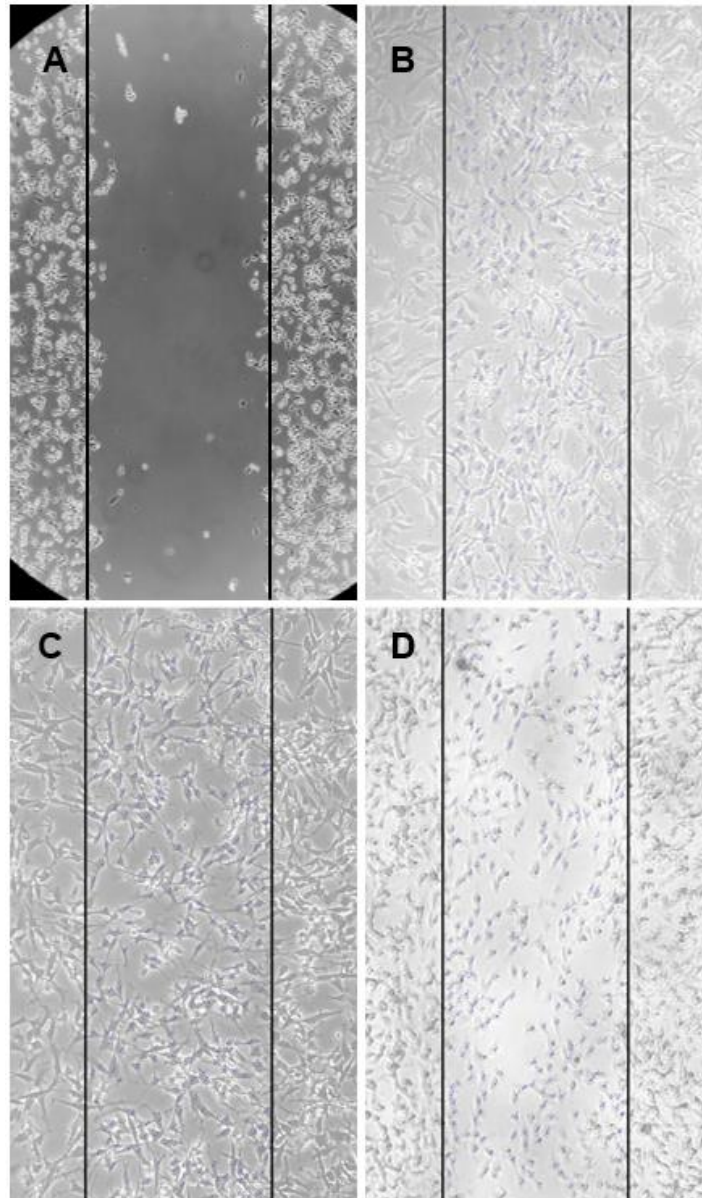


Figura 9. Microscopia de contraste de fases. Células control a las 0h (A) y 24h (considerado 100% de cierre de la herida) (B). Incubación con 25 μM del EA (C). Incubación con 50 μM del EA (D).

5.4. Análisis morfológico celular.

Para analizar los cambios morfológicos inducidos por el EA y la swainsonina natural (SW), las células C6 se tiñeron con los fluorocromos naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE). Las células de glioma no tratadas mostraban una fluorescencia verde, un núcleo verde claro con estructura intacta y presentaban cierta fluorescencia roja-anaranjada punteada en el citoplasma homogéneamente distribuida correspondiente a los lisosomas (Fig. 10A). Tras 48 h de incubación con 300 μM de EA, se observaron células con fluorescencia rojo-anaranjada irregular en su periferia debido a la permeabilización por bromuro de etidio compatible con necrosis (Fig. 10B). Por otro lado, luego del 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 (Fig. 10C).

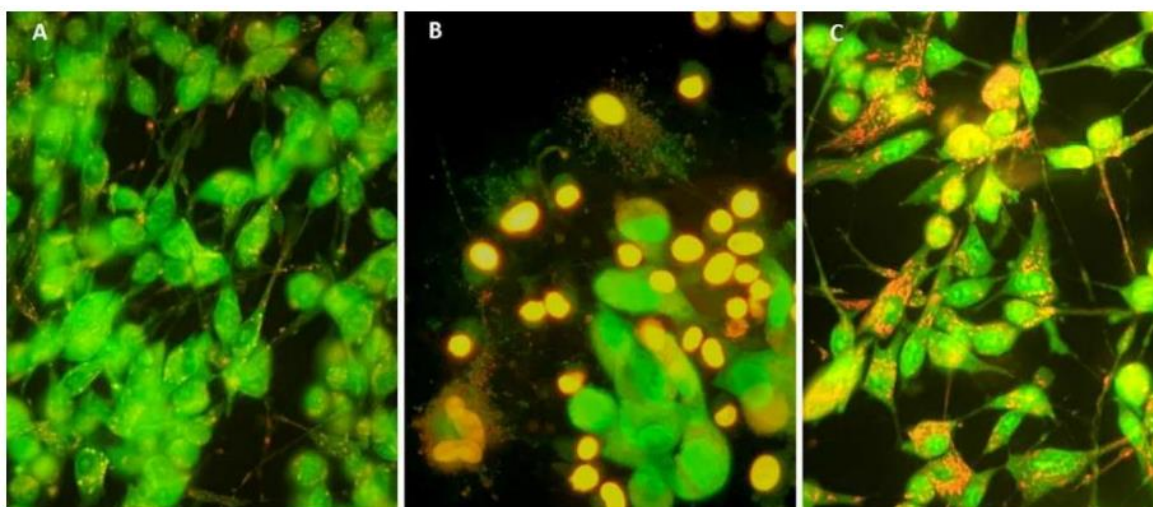


Figura 10. Tinción fluorescente con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE). Células de control (A), EA (300 μM) (B), SW natural (1000 μM) (C).

6. DISCUSIÓN

Hasta el momento se han identificado tres familias de plantas que contienen swainsonina: Fabaceae, Malvaceae y Convolvulaceae; encontrando en ellas varias especies que resultan tóxicas para los animales (Molyneux *et al.*, 1995; Stegelmeier *et al.*, 1995; Colodel *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2017). La especie utilizada en este trabajo, *Ipomoea carnea* Jacq., debe sus propiedades toxicológicas principalmente al alcaloide indólico swainsonina (Armien *et al.*, 2007; de Carvalho Nunes *et al.*, 2019). Sin embargo, otros autores sugieren que serían las calisteginas los únicos alcaloides responsables de la toxicidad de esta especie (Dorling *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2019).

En el presente estudio, al comparar la citotoxicidad de un extracto acuoso de *I. carnea* Jacq. con el efecto de una swainsonina natural en cantidades equivalentes sobre la línea celular tumoral C6 de células gliales, se observó que el extracto alcaloidal (EA) disminuyó la viabilidad celular e indujo citólisis en concentraciones superiores a 200 μM . Sin embargo, Cholic *et al.*, (2020) utilizando un modelo de cultivo primario de células gliales, observaron que con concentraciones de hasta 250 μM del EA de *I. carnea* Jacq. no evidenciaban efectos citotóxicos. Esto podría deberse a una mayor susceptibilidad del modelo de cultivo de la línea celular con respecto al cultivo glial primario.

Numerosos autores han confirmado que tanto la swainsonina sintética como también una natural aislada de la especie *Oxytropis kansuensis* Bunge son citotóxicas en una gran variedad de líneas celulares (Sun *et al.*, 2007, 2009, 2019; Li *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2023). No obstante, en este trabajo la viabilidad de la línea celular C6 no se vio afectada luego de 48 horas de incubación con concentraciones de hasta 1000 μ M de la swainsonina natural aislada de *Astragalus lentiginosus* Douglas. Esto sugiere que el efecto citotóxico presentado por el EA de *I. carnea* Jacq. sobre las células de glioma no sería causado principalmente por la swainsonina.

La swainsonina se acumula rápidamente en los lisosomas de las células, tanto *in vitro* como *in vivo*, causando la inhibición de la enzima α -manosidasa II y dando lugar a un cuadro de mannosidosis (Ikeda *et al.*, 2003; Malm y Nilssen, 2008). Esto provoca una degeneración vacuolar extensa, la cual es la principal característica patológica en animales envenenados con estas plantas (De Balogh *et al.*, 1999; Armien *et al.*, 2007). Además, Wang *et al.*, (2019) y Liu *et al.*, (2023) reportaron que al utilizar swainsonina pura en cultivos de células epiteliales renales y neuronas del hipocampo, se observa la aparición de vacuolas en el citoplasma de estas células. Previamente, Wang *et al.*, (2021) confirmaron que la swainsonina puede provocar la acumulación intracelular de carbohidratos complejos y glicoproteínas, induciendo la apoptosis y la autofagia. Los ensayos de microscopía de contraste de fases y la tinción de fluorescencia realizadas en este trabajo revelaron vacuolización de las células gliales C6 tras la incubación con la concentración más alta utilizada de swainsonina natural, indicativo de un posible bloqueo en la degradación autofágica debido a una alteración de la función normal de los lisosomas. Por otro lado, la tinción naranja fluorescente evidenciada por la permeabilidad de las membranas celulares al bromuro de etidio podría sugerir que la incubación de la línea celular C6 con el EA de *I. carnea* Jacq. desencadenó un mecanismo compatible con la necrosis. Debido a la observación de ambos posibles mecanismos de muerte celular, autofagia y necrosis, se sugiere que pueden existir otros compuestos en el EA (como las calisteginas) además de la swainsonina que contribuyen a los efectos observados.

Los resultados expuestos anteriormente concuerdan con los obtenidos en un modelo *in vivo* en el cual se inocularon ratas con swainsonina o con el EA de *I. carnea* Jacq., y en ambos casos se observó vacuolización en diversos órganos. Sin embargo, la gravedad de este efecto fue significativamente mayor en los animales tratados con el EA de *I. carnea* Jacq., lo que sugiere la participación de compuestos distintos del alcaloide indólico (Hueza *et al.*, 2005). Otro estudio *in vivo*, realizado por Stegelmeier *et al.*, (2008) sugiere, por el contrario, que las calisteginas son menos tóxicas que la swainsonina en ratones.

Investigaciones previas han revelado el potencial antitumoral de extractos de plantas que contienen SW en modelos *in vivo*, donde se ha observado una reducción significativa en la proliferación tumoral, como describen Anand *et al.*, (2013) y Shukla *et al.*, (2018). Como se mencionó, dos procesos fundamentales involucrados en la metástasis tumoral son la adhesión y migración de las células tumorales. En este sentido, solo se registran trabajos en los que se evaluó el efecto de SW sintéticas sobre los procesos mencionados. Rooprai *et al.*, (2001) demostraron un efecto inhibitorio significativo sobre la adhesión celular de cuatro líneas de cultivo primario obtenidas de tumores del sistema nervioso y Sun *et al.*, (2009) y Przybylo *et al.*, (2005) reportaron de manera similar el efecto de SW sobre la migración de células de melanoma murino y carcinoma de vejiga respectivamente. En este trabajo final de graduación, los resultados obtenidos demuestran por primera vez el efecto inhibitorio del extracto alcaloidal de *Ipomoea carnea* Jacq. tanto sobre la adhesión como la migración de las células C6 de glioma.

7. CONCLUSIÓN

El extracto alcaloidal de *Ipomoea carnea* Jacq. demostró ser citotóxico sobre la línea C6 de células tumorales gliales de manera dosis dependiente; en cambio, la swainsonina natural utilizada no demostró citotoxicidad en ninguna de las concentraciones ensayadas. Por lo que el alcaloide indólico identificado en *I. carnea* Jacq. no sería el único responsable de la citotoxicidad *in vitro* sobre las células de glioma. Las calisteginas podrían contribuir actuando sinérgicamente con la swainsonina y ser responsables de la citotoxicidad demostrada.

Además, al utilizar concentraciones no citotóxicas para evaluar el potencial efecto antitumoral de dicho extracto, éste evidenció inhibir la adhesión celular de manera proporcional a las concentraciones ensayadas, así como también la migración celular. Estos resultados sugieren que los compuestos estudiados poseen un potencial efecto antitumoral, por lo cual es de interés continuar en esta línea de investigación para poder dilucidar cuales son los mecanismos de acción de estos procesos inhibitorios y así proporcionar nuevos conocimientos para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adsul V. B., Khatiwora E., Torane R. & Deshpande N. R. (2012). Antimicrobial activities of *Ipomoea carnea* leaves. J. Nat. Prod. Plant Resour. 2(5), 597-600.
- Ambiga S. & Jeyaraj M. (2015). Evaluation of in vitro Antioxidant Activity of *Ipomoea carnea* Jacq. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 4(5), 327-338.
- Ambiga S., Narayanan R., Durga G., Sukumar D. & Madhavan S. (2007). Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea carnea* Jacq. Ancient Science of Life. 26(3), 45-51.
- Anand G., Sumithira G., Chinna Raja R., Muthukumar A. & Vidhya G. (2013). In vitro an in vivo anticancer activity of hydro-alcoholic extract of *Ipomoea carnea* leaf against Ehrlich Ascites Carcinoma cell lines. Internacional Journal of Advance Pharmaceutical Genuine Research. 1 (1), 39-54.
- Andrade Carvalho A., Marçal da Costa P., Gregório Da Silva Souza L., Leda G. Lemos T., Negreiros Nunes Alves A. P., Pessoa C. & Odorico de Moraes M. (2013). Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. Life Sciences. 93, 201-207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.05.018>
- Armien A.G., Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Frese K. (2007). Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). Vet. Pathol. 44(2): 10-184. <https://doi:10.1354/vp.44-2-170>
- Asano N., Kato A., Osekim K., Kizu K. & Matsui K. (1995). Calystegins of *Physalis alkekengi* var. *Francheti* (Solanaceae) structure determination and their glycosidase inhibitory activities. Eur. J. Biochem; 229 (2): 369-376, <https://10.1111/j.1432-1033.1995.0369k.x>
- Bustillo S., Gay C.C., Denegri M.E.G., Ponce-Soto L.A., de Kier Joffé E.B., Acosta O. & Leiva L.C. (2012). Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. Toxicon;59(2):338-343. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.007>
- Calderon L. A., Sobrinho J. C., Zaqueo K. D., de Moura A. A., Grabner A. N., Mazzi M. V., Marcussi S., Nomizo A., Fernandes C. F. C., Zuliani J. P., Carvalho B. M. A., da Silva S. L., Stábeli R. G. & Soares A. M. (2014). Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in cancer therapy. In BioMed Research International (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/203639>
- Chiarini F. & Ariza Espinar L. (2006). Flora fanerogámica Argentina: Programa ProFlora (Conicet). Angiospermae, Dicotyledoneae: 249. Convolvulaceae. Museo Botánico, IMBIV. 96, 1-81.
- Cholic L.A., Pistán M.E., Torres A.M., Ortega H.H., Gardner D.R. & Bustillo S. (2020). Cytotoxic activity induced by the alkaloid extract from *Ipomoea carnea* on primary murine mixed glial cultures. Toxicon; 188: 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.10.019>
- Colodel E. M., Gardner D. R., Zlotowski P. & Driemeier D. (2002). Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. Veterinary and Human Toxicology, 44(3), 177–178.
- Cook D., Gardner D. R., Welch K. D. & Allen, J. G. (2017). A survey of swainsonine content in *Swainsona* species. The Rangeland Journal, 39(2), 213- 218.
- de Balogh K.K.I.M., Dimande A.P., Van Der Lugt J.J., Molyneux R.J., Naude T.W. & Welman W.G. (1999). A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. J. Vet. Diagn. Inv.; 11: 266-273. <https://doi:10.1177/104063879901100310>

- de Carvalho Nunes L., Stegelmeier B.L., Cook D., Pfister J.A., Gardner D.R., Riet-Correa F. & Welch K.D. (2019). Clinical and pathological comparison of *Astragalus lentiginosus* and *Ipomoea carnea* poisoning in goats. *Toxicon*; 171: 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.016>
- Debeir O., Adanja I., Kiss R. & Decaestecker C. (2008). Models of cancer cell migration and cellular imaging and analysis. Transworld Research Network, Kerala, India.
- Dorling P.R., Huxtable C.R. & Vogel P. (1978). Lysosomal storage in *Swainsona* spp. toxicosis: an induced mannosidosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.*; 4(4): 285-295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1978.tb00547.x>
- Dorling P.R., Colegate S.M., Allen J.G., Nickels R., Mitchell A.A., Main D.C. & Madin, B. (2004). Calystegines isolated from *Ipomoea* spp. possibly associated with an ataxia syndrome in cattle in North Western Australia. *Poisonous Plants and Related Toxins*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 140–145.
- Fatima N., Rahman M. M., Khan A. & Fu J. (2018). A review on *Ipomoea carnea*: pharmacology, toxicology and phytochemistry. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 11 (2), 55-62. <https://doi.org/10.1515/jcim-2013-0046>.
- Gardner D.R., Molyneux R.J. & Ralphs M.H. (2001). Analysis of swainsonine: extraction methods, detection, and measurement in populations of locoweeds (*Oxytropis* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 49, 4573–4580.
- Gupta R., Gabrielsen B. & Ferguson S. M. (2005). Nature's Medicines: traditional knowledge and intellectual property management. Case studies from the National Institutes of Health (NIH), USA. *Current Drug Discovery Technologies*. 2, 203-209. <https://doi.org/10.2174/157016305775202937>
- Haase R. (1999). Crecimiento estacional de "algodão-bravo" (*Ipomoea carnea* spp. *fistulosa*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 159-163.
- Haraguchi M., Gorniak S.L., Ikeda K., Minami Y., Kato A., Watson A.A. & Asano N. (2003). Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *J. Agric Food Chem.*; 51 (17); 4995-5000. <https://doi.org/10.1021/jf0341722>
- Hirohashi S. & Kenai Y. (2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Science*. 94(7), 575-581. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01485.x>
- Hueza I.M., Fonseca E.S.M., Paulino C.A., Haraguchi M. & Gorniak S.L. (2003). Evaluation of immunomodulatory activity of *Ipomoea carnea* on peritoneal cells of rats. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 87(2-3): 181-186. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00138-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00138-7)
- Hueza I.M., Guerra J.L., Haraguchi M., Asano N. & Gorniak S.L. (2005). The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57 (1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.02.004>
- Ikeda K., Kato A., Adachi I., Haraguchi M. & Asano N. (2003). Alkaloids from the poisonous plant *Ipomoea carnea*: effects on intracellular lysosomal glycosidase activities in human lymphoblast cultures. *J. Agric. Food Chem.* 51 (26), 7642–7646. <https://doi.org/10.1021/jf035003k>
- *Ipomoea carnea*, descripción. (2023, 13 de diciembre). *Flora Argentina*. <https://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/11771>

- Khalili A. A. & Ahmad M. R. (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. International Journal of Molecular Sciences. 16, 18149-18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>
- Lee S. J., Sakurai H., Oshima K., Kim S. H. & Saiki I. (2003). Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of a new matrix metalloproteinase inhibitor, TN-6b. European Journal of Cancer, 39(11), 1632–1641. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(03\)00375-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(03)00375-7)
- Li Z., Xu X., Huang Y., Ding L., Wang Z., Yu G. & Tong D. (2012). Swainsonine activates mitochondria-mediated apoptotic pathway in human lung cancer A549 cells and retards the growth of lung cancer xenografts. Int. J. Biol. Sci. 8 (3), 394. <https://doi:10.7150/ijbs.388>
- Liu Y., Zhang S., Wang W., Tang S., Zhu Y., Wang M. & Lu H. (2023). Swainsonine induced vacuolar degeneration is regulated by mTOR-mediated autophagy in HT22 cells. Toxicol. Lett. 373, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.11.007>
- Luo B.H., Carman C.V. & Springer T.A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. Annu Rev Immunol 25, 619-647.
- Malm D. & Nilssen O. (2008). Alpha-mannosidosis. Orph. J. Rare Dis.; 3(1): 21. <https://doi:10.1186/1750-1172-3-21>.
- Meira M., Pereira da Silva E., David J. M. & David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 22(3), 682-713. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000025>
- Molyneux R.J., Mckenzie R.A., O'Sullivan B.M. & Elbein A.D. (1995). Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegineB2 in Weir vine (*Ipomoea* sp. Q6 [aff. calobra]) and correlation with toxicity. J. Nat. Prod. 58, 878–886. <https://doi:10.1021/np50120a009>
- NIH (2023). National Cancer Institute. National Institutes of Health, USA Government.
- Paludo K.S., Gremski L.H., Veiga S.S., Chaim O.M., Gremski W., de Freitas Buchi D., Nader H.B., Dietrich C.P. & Franco C.R. (2006). The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. Toxicon 47, 844-853.
- Przybylo M., Litynska A. & Pochec E. (2005). Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urothelial and T24 bladder cancer cells: role of glycosylation. Biochimie, 87. 133-142. <https://doi:10.1016/j.biochi.2004.12.003>
- Rooprai H. K., Kandaneeratchi A., Maidment S. L., Christidou M., Trillo-Pazos G., Dextert D. T., Rucklidge G. J., Widmer W. & Pilkinton, G. J. (2001). Evaluation of the effects of swainsonine, captopril, tangeretin and nobiletin on the biological behaviour of brain tumour cells in vitro. Neuropathology and Applied Neurobiology. 27, 29-39. <https://doi.org/10.1046/j.0305-1846.2000.00298.x>
- Salinas L.M., Balseiro A., Jirón W., Peralta A., Muñoz D., Fajardo J., Marín J.F.G. (2019). Neurological syndrome in goats associated with *Ipomoea trifida* and *Ipomoea carnea* containing calystegines. Toxicon; 157:8-11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.291>
- Shukla R., Gupta G., Kashaw S. M., Jain A. P. & Lodhu S. (2018). Wound healing effect of ethanolic extract from Morning Glory (*Ipomoea carnea* Jacq.) leaves by using different models in rats. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 31 (4), 1355-1361.

- Stegelmeier B.L., Molyneux R.J., Asano N., Watson A.A. & Nash R.J. (2008). The comparative pathology of the glycosidase inhibitors swainsonine, castanospermine, and calystegines A3, B2, and C1 in mice. *Toxicol. Pathol.* 36 (5), 651–659. <http://doi:10.1177/0192623308317420>
- Stegelmeier B.L., Molyneux R.J., Elbein A.D. & James L.F. (1995). The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. *Vet. Pathol.* 32 (3), 289–298. <https://doi:10.1177/030098589503200311>
- Sun J.Y., Yang H., Miao S., Li J.P., Wang S.W., Zhu M.Z. & Yang Q. (2009). Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 16 (11), 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.012>
- Sun J.Y., Zhu M.Z., Wang S.W., Miao S., Xie Y.H. & Wang J.B. (2007). Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine. *Phytomedicine* 14 (5), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.08.003>
- Sun L., Jin X., Xie L., Xu G., Cui Y. & Chen Z., (2019). Swainsonine represses glioma cell proliferation, migration and invasion by reduction of miR-92a expression. *BMC Cancer* 19 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5425-7>
- Tulsiani D. R. & Touster O. (1983). Swainsonine causes the production of hybrid glycoproteins by human skin fibroblasts and rat liver Golgi preparations. *Journal of Biological Chemistry*, 258(12), 7578–7585.
- Wang S., Guo Y., Yang C., Huang R., Wen Y., Zhang C. & Zhao B. (2021). Swainsonine triggers paraptosis via ER stress and MAPK signaling pathway in rat primary renal tubular epithelial cells. *Front. Pharmacol.* 12, 715285. <https://doi:10.3389/fphar.2021.715285>
- Wang S., Wang J., Yang L., Guo R., Huang E., Yang H. & Lu H. (2019). Swainsonine induces autophagy via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to injure the renal tubular epithelial cells. *Biochimie* 165, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.018>
- WHO (2023). World Health Organization. International Agency for Research on Cancer.
- You N., Liu W., Wang T., Ji R., Wang X., Gong Z. & Tao K. (2012). Swainsonine inhibits growth and potentiates the cytotoxic effect of paclitaxel in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 28 (6), 2091–2100. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2035>