










## Enfermedad de almacenamiento lisosomal adquirida en cobayos: Estudio clínico-patológico comparativo del rol de la swainsonina y las calisteginas

García, E.N.<sup>1</sup> ; Alucin, A.K.<sup>1</sup> ; Gimenez, D.<sup>1</sup> ; Martinez, A.<sup>2</sup> ; Cook, D.<sup>3</sup> ; Cholich, L.A.<sup>1,4\*</sup> 

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, 3400. Corrientes, Argentina.

<sup>2</sup>Grupo de Salud Animal, Estación Experimental Agropecuaria Bariloche, INTA, 8400. San Carlos de Bariloche, Argentina. <sup>3</sup>USDA-ARS Poisonous Plant Research Laboratory, Logan, UT, USA. <sup>4</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

 luciana.cholich@vet.unne.edu.ar

### Resumen

Las plantas tóxicas que contienen alcaloides inhibidores de enzimas lisosomales, como *Ipomoea carnea* y *Astragalus illini*, inducen una enfermedad de almacenamiento lisosomal adquirida, principalmente en rumiantes. Si bien la swainsonina (SW) es el principal agente tóxico, el rol de las calisteginas continúa siendo controvertido. El objetivo de este estudio fue comparar los efectos tóxicos de *I. carnea* con (IcSW+) y sin SW (IcSW-), y *A. illini* (Ai) en cobayos. Los animales tratados presentaron disminución significativa del consumo y pérdida de peso siendo más marcada en IcSW-. La vacuolización de leucocitos mononucleares apareció de forma más temprana e intensa en Ai e IcSW+, mientras que en IcSW- fue tardía y de menor magnitud. Bioquímicamente, todos los grupos mostraron aumento de AST, con valores significativamente más elevados en IcSW+ respecto a IcSW- y Ai. Histopatológicamente, se observó vacuolización citoplasmática en hígado y riñón en todos los grupos tratados, con mayor severidad en aquellos que contenían SW. A nivel del sistema nervioso central, las lesiones se restringieron a IcSW+ y Ai, con un mayor porcentaje de neuronas vacuoladas en IcSW+. La lectinohistoquímica evidenció mayor acumulación de glicoconjugados en los grupos expuestos a SW, especialmente en IcSW+ y Ai, en correlación con la intensidad de las lesiones. En conjunto, los resultados indican que las calisteginas contribuyen significativamente a la toxicidad, potenciando los efectos de la SW, en especial a nivel hepático, renal y neurológico. Este estudio proporciona evidencia sobre la toxicidad individual y combinada de estos alcaloides, y destaca la importancia de considerar el perfil completo de metabolitos de las plantas al evaluar su potencial toxigénico.

**Palabras clave:** *Astragalus illini*, vacuolización citoplasmática, *Ipomoea carnea*, lectinohistoquímica, plantas tóxicas.

## Acquired lysosomal storage disease in guinea pigs: A comparative clinical-pathological study of the role of swainsonine and calystegines

**Abstract.** Toxic plants containing lysosomal enzyme-inhibiting alkaloids, such as *Ipomoea carnea* and *Astragalus illini*, induce acquired lysosomal storage disease, mainly in ruminants. Although swainsonine (SW) is considered the primary toxic agent, the role of calystegines remains controversial. The aim of this study was to compare the toxic effects of *I. carnea* with (IcSW+) and without SW (IcSW-), and *A. illini* (Ai) in guinea pigs. Treated animals showed a significant reduction in feed intake and body weight, which was more pronounced in IcSW- group. Mononuclear leukocyte vacuolization appeared earlier and was more severe in Ai and IcSW+, whereas in IcSW- it was delayed and less pronounced. Biochemically, all treated groups exhibited increased AST activity, with significantly higher values in IcSW+ compared with IcSW- and Ai. Histopathologically, cytoplasmic vacuolization was observed in the liver and kidneys of all treated groups, with greater severity in those containing SW. In the central nervous system, lesions were restricted to IcSW+ and Ai, with a higher percentage of vacuolated neurons in IcSW+. Lectin histochemistry

revealed greater accumulation of glycoconjugates in groups exposed to SW, particularly in IcSW+ and Ai, correlating with lesion severity. Overall, the results indicate that calisteginas contribute significantly to toxicity by potentiating the effects of SW, especially at the hepatic, renal, and neurological levels. This study provides evidence of the individual and combined toxicity of these alkaloids and highlights the importance of considering the complete metabolite profile of toxic plants when assessing their toxigenic potential

**Key words:** *Astragalus illini*, cytoplasmic vacuolization, *Ipomoea carnea*, lectin histochemistry, toxic plants.

## INTRODUCCIÓN

Existen plantas tóxicas, como *Ipomoea carnea* y especies de los géneros *Astragalus*, *Oxytropis*, *Sida* y *Swainsona*, que al ser consumidas por el ganado provocan una enfermedad conocida como  $\alpha$ -manosidosis adquirida (Cholich et al. 2021). El principal principio tóxico es un alcaloide indolizidínico bien caracterizado denominado swainsonina (SW), el cual es un potente inhibidor de las enzimas  $\alpha$ -manosidasa lisosomal y la manosidasa II de Golgi (Malm 2008). Sin embargo, *I. carnea* contiene además otros alcaloides nortropánicos denominados calisteginas, quienes inhiben las glucosidasas (Binaglia et al. 2019, Salinas et al. 2019).

Se ha establecido que varias especies de *Astragalus* y *Oxytropis* están asociadas a un hongo endófito (*Alternaria* sección *Undifilum*) que produce SW (Braun et al. 2003, Grum et al. 2013, Pistán et al. 2024). Asimismo, estudios en *I. carnea* han reportado la presencia de un hongo (orden Chaetothyriales) con comportamiento epibiótico, por lo que su observación es un prerrequisito para la identificación de SW en esta planta (Pistán et al. 2022).

En Argentina la  $\alpha$ -manosidosis adquirida ha sido ampliamente documentada en distintas regiones del país, constituyendo un problema sanitario relevante en sistemas productivos extensivos con bovinos, ovinos, caprinos y llamas. Diversas especies vegetales distribuidas en diferentes ecorregiones, como *I. carnea*, *I. hieronymi*, *A. garbancillo*, *A. pehuenches*, *A. punae*, *A. arequipensis* y *Sida rodrigoii*, han sido identificadas como causantes de la intoxicación (Cholich et al. 2021, Marín et al. 2022, 2025).

El consumo prolongado de estas plantas tóxicas ocasiona en los animales una pérdida progresiva de peso y signos clínicos relacionados con un trastorno nervioso que se caracteriza por temblores, anormalidades en la marcha, dificultad para pararse y aumento de la base de sustentación. Las lesiones histopatológicas consisten principalmente en vacuolización neuro visceral (Armién et al. 2007, Cholich et al. 2021).

Existe controversia sobre el papel de las calisteginas en la intoxicación por *I. carnea*. Mientras que algunos autores sugieren que estos alcaloides no contribuyen a la toxicidad en cabras (de Carvalho Nunes et al. 2019), otro estudio reportó un síndrome neurológico asociado al consumo natural de *I. trifida* e *I. carnea*, plantas que solo contenían calisteginas (Salinas et al. 2019). Estos hallazgos resaltan la necesidad de realizar estudios para caracterizar con mayor precisión la intoxicación causada por estas plantas, considerando que existen poblaciones de *I. carnea* con y sin SW (Pistán et al. 2022). Además, es fundamental dilucidar el papel de los alcaloides individuales y su posible interacción en el desarrollo del síndrome tóxico.

Diferentes modelos animales han sido empleados para estudiar la intoxicación experimental producida por las plantas que contienen SW (Hueza et al. 2005, Stegelmeier et al. 2008, Cholich et al. 2009, Li et al. 2012), resultando el cobayo un buen modelo animal para la reproducción experimental a nivel neuronal (Cholich et al. 2013). A partir de esto, el objetivo del presente estudio fue comparar los efectos tóxicos inducidos en cobayos por el consumo de diferentes poblaciones de *I. carnea* con calisteginas y con y sin SW, y *A. illini* solo con SW, mediante una evaluación clínico-patológica, con el fin de esclarecer el rol relativo de los distintos alcaloides involucrados en su toxicidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** *I. carnea* fue recolectada (15 kg de materia verde) en distintas localidades de las provincias de Corrientes (departamentos Capital y San Cosme) y Chaco (departamentos Mayor Jorge Luis Fontana, San Fernando y Chacabuco), Argentina. En el laboratorio, las plantas fueron clasificadas según Pistán et al. (2022), mediante la observación macroscópica de acuerdo con la presencia y ausencia del hongo simbionte, el cual se ubica sobre la superficie de las hojas. Ejemplares de los especímenes fueron depositados en el Herbario CTES del Instituto de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias del Nordeste (UNNE-CONICET) en Corrientes, Argentina. Asimismo, 15 kg de tallos y hojas de *A. illini* fueron recolectados en los alrededores de Manuel Choique, correspondiente al departamento de Ñorquincó, provincia de Río Negro, Argentina. Un espécimen fue archivado en el Herbario de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Bariloche, Río Negro, Argentina.

Muestras de hojas de *I. carnea* con y sin hongo, y tallos y hojas de *A. illini* fueron secados a 37 °C hasta peso constante y finamente molidos empleando un molinillo FW100 (BioSmartest, China). Se obtuvo un rendimiento de materia seca (MS) del 30% para ambas especies.

**Identificación y determinación de Swainsonina y Calisteginas.** Para la identificación y cuantificación de los alcaloides SW y calisteginas de las muestras vegetales se empleó la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), siguiendo la metodología de Gardner et al. (2001). Las muestras de *I. carnea* que presentaban SW y calisteginas se identificaron como IcSW+, las muestras que no contenían SW, pero tenían calisteginas se identificaron como IcSW-, en tanto que las muestras de *A. illini* se identificaron como Ai.

**Diseño experimental.** Dieciséis cobayos (cepa Hartley) machos de 4 semanas de edad con un peso inicial

de  $250 \pm 50$  g fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNNE. Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas de temperatura, humedad e iluminación ( $25 \pm 2$  °C, 55-60%, 12 h, respectivamente).

Los animales se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos, el Grupo I (control) y los Grupos tratados: GII (IcSW+), GIII (IcSW-) y GIV (Ai). Los grupos tratados recibieron alimento compuesto por 50% de polvo de alimento balanceado comercial y 50% de polvo del material vegetal correspondiente, reconstituido en forma de pellet. Los animales controles solo recibieron alimento comercial. Todos los grupos recibieron alfalfa (*Medicago sativa*) en forma de fardos y agua *ad libitum*. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCV-UNNE) según Protocolo N° 0094/2022.

**Control clínico.** Se registró en forma semanal el peso vivo y el estado clínico general (la facie, actitudes, estado general del manto, condición corporal y cambios del comportamiento). Asimismo, se calculó el consumo diario de pellets mediante la determinación de la diferencia entre el alimento ofrecido y el remanente.

**Análisis hematológico.** Se obtuvieron muestras semanales de sangre periférica mediante punción de la vena auricular. Se hicieron los frotis respectivos y las láminas se tiñeron con May-Gründwald-Giemsa (García et al. 2015). Los extendidos se examinaron mediante un microscopio Primo Star Zeiss (Germany) para detectar células blancas vacuoladas, utilizando un aumento de 100x en 10 campos seleccionados al azar. Los resultados se expresaron en porcentaje.

**Bioquímica clínica.** Previo al sacrificio, los animales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y xilacina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Se extrajo sangre de la vena cava caudal para la determinación de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH). El análisis se realizó mediante el método cinético a  $37$  °C, utilizando kits comerciales de Wiener lab. (Rosario, Argentina).

**Análisis post mortem.** Tras  $45 \pm 5$  días de intoxicación, los animales fueron sometidos a eutanasia debido a la gravedad de los signos clínicos. Se recolectaron muestras de hígado, riñón y del sistema nervioso central (SNC) para su estudio histopatológico (Garman 2011). Los tejidos se fijaron en formol al 10% bufferado, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de  $5 \mu\text{m}$ , los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las preparaciones fueron evaluadas mediante un microscopio Primo Star Zeiss (Germany). Adicionalmente, en los distintos núcleos del

tronco encefálico se analizaron 10 campos seleccionados al azar a un aumento de 40X, cuantificándose el número de neuronas vacuoladas y expresando los resultados en porcentaje.

**Lectinohistoquímica.** Esta técnica permite establecer el patrón de distribución de los carbohidratos almacenados en diferentes tipos de células. Se aplicó sobre secciones de tejidos previamente fijados, parafinados y cortado a  $5 \mu\text{m}$ . Los cortes fueron incubados con tres lectinas a una concentración de  $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Según estudios previos, las lectinas con mejor marcación para este tipo de almacenamiento lisosomal son la Concanavalina A (Con-A), la Aglutinina de germen de trigo (WGA) y la Aglutinina de *Lens culinaris* (LCA) (Cholich et al. 2009). Como sistema de detección se utilizó el método basado en estreptavidina-biotina (Dako, Carpintería, CA). Como cromógeno se empleó 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB) (Dako, Carpintería, CA). Finalmente se utilizó hematoxilina de Harris como coloración de contraste. La intensidad de la unión a la lectina se cuantificó subjetivamente de 0 (ninguna) a 3 (muy positiva).

**Análisis estadístico.** Los valores obtenidos se expresaron con su media  $\pm$  desviación estándar (DE). Se comprobó la significación estadística de las diferencias entre medias mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey. El análisis estadístico se realizó con el programa Infostat. El nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación y determinación de los alcaloides.

Se identificó SW en las hojas de *I. carnea* con presencia del hongo. En contraste, las muestras de hojas carentes del hongo fueron negativas a SW. Asimismo, las concentraciones promedio de los alcaloides (SW y los subtipos de calisteginas  $B_1$ - $B_3$  y  $C_1$ ) fueron determinadas en todas las muestras vegetales analizadas mediante HPLC-MS/MS (Tabla 1).

En el presente estudio, la concentración media de SW en *A. illini* fue de 0,02%, valor que se encuentra dentro del rango ( $<0,001$ - $0,08\%$ ) reportado por Martínez et al. (2019). No obstante, las concentraciones de SW determinadas en ambas especies superaron el umbral señalado por Molyneux et al. (1995), quienes demostraron que niveles iguales o superiores a 0,001% resultan suficientemente tóxicos para los animales. A diferencia de otros trabajos, en los que las muestras vegetales fueron recolectadas en una única área (Salinas et al. 2019, Pistán et al. 2022), en el presente estudio se analizaron muestras provenientes de múltiples localidades de dos provincias, lo que permitió corroborar que las muestras de *I. carnea* sin la presencia del hongo endófito no contienen SW.

**Tabla 1.** Concentración promedio de alcaloides en las muestras vegetales.

Muestras	Swainsonina (%)	Calisteginas (%)
<i>Ipomoea carnea</i> con hongo	$0,13 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,02$
<i>Ipomoea carnea</i> sin hongo	0	$0,09 \pm 0,04$
<i>Astragalus illini</i>	$0,02^*$	0

\*Las muestras fueron recolectadas en una única área, por lo que no se tiene el valor de la desviación estándar.

**Signos clínicos.** Todos los grupos tratados presentaron pelo hirsuto, junto con una disminución significativa del consumo y pérdida de peso en comparación con el grupo control ( $p < 0,05$ ), lo que indica un claro compromiso del estado nutricional y metabólico asociado a la ingestión de estas plantas (Tabla 2). En este sentido, se ha demostrado que en animales intoxicados se producen alteraciones neuromusculares y gastrointestinales que comprometen la eficiencia alimenticia más allá de una simple disminución en la ingesta (Pan et al. 1993, Stegelmeier et al. 2005, Armíen et al. 2007).

No obstante, resulta particularmente relevante que el grupo IcSW- haya presentado una mayor pérdida

de peso y menor consumo respecto de IcSW+ y Ai, lo que sugiere un posible efecto modulador de la SW sobre el comportamiento alimentario. Si bien la SW es reconocida como el principal agente tóxico responsable de la enfermedad de almacenamiento lisosomal adquirida, también se ha documentado que su presencia puede inducir fenómenos de avidez, habituación y facilitación social en animales intoxicados (Riet-Correa y Méndez 2000, Colodel et al. 2002, Marin et al. 2025). En este contexto, la menor pérdida de peso observada en IcSW+ y Ai podría explicarse, al menos en parte, por los efectos conductuales inducidos por la SW, que favorecerían un mayor consumo relativo.

**Tabla 2.** Consumo total y variación de peso de cobayos que recibieron *Ipomoea carnea* (Ic) con (SW+) y sin hongo (SW-), y *Astragalus illini* (Ai) durante  $40 \pm 5$  días.

Grupos	Consumo total G	Variación de peso corporal (%)
GI (control)	1.335 $\pm$ 30	+52 $\pm$ 2,1
GII (IcSW+)	1.134 $\pm$ 42,3*	- 16 $\pm$ 3,5*
GIII (IcSW-)	1.061,6 $\pm$ 96,4*	-19 $\pm$ 3,3*
GIV (Ai)	1.244,7 $\pm$ 39,1*	-10 $\pm$ 2,2*

\*Diferencia significativa entre los grupos tratados y el control ( $p < 0,05$ ).

**Efectos en sangre periférica.** El análisis del frotis reveló la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas de tamaño variable en leucocitos mononucleares de los grupos Ai y IcSW+ desde la primera y segunda semana respectivamente, mientras que en IcSW- estas se observaron recién a partir de la cuarta semana. El porcentaje de vacuolización aumentó progresivamente con el tiempo, alcanzando los valores más elevados en el grupo Ai, seguido por IcSW+ y, en menor medida, IcSW- (Tabla 3).

Este patrón sugiere una asociación directa entre la presencia de SW y la aparición temprana y más intensa de vacuolización, en concordancia con su efecto inhibitor lisosomal. En contraste, la respuesta más tardía y leve en IcSW- indicaría un menor impacto de las calisteginas en ausencia de SW. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Huxtable y Gibson (1970) y García et al. (2015), quienes describen la vacuolización leucocitaria como un marcador temprano de intoxicación por SW.

**Tabla 3.** Porcentaje de vacuolización de leucocitos mononucleares en cobayos que recibieron *Ipomoea carnea* (Ic) con (SW+) y sin hongo (SW-), y *Astragalus illini* (Ai) durante  $40 \pm 5$  días.

Semanas	Vacuolización (%)			
	Control	G II (IcSW+)	G III (IcSW-)	G IV (Ai)
1	0	5,5 $\pm$ 1,9	0	15,5 $\pm$ 7,0*
2	6,0 $\pm$ 1,4	9,2 $\pm$ 1,3*	5,2 $\pm$ 0,5	23,2 $\pm$ 1,3*
3	6,0 $\pm$ 1,2	18,0 $\pm$ 0,8*	8,8 $\pm$ 0,5	25,5 $\pm$ 2,4*
4	6,0 $\pm$ 2,0	27,0 $\pm$ 1,6*	13,8 $\pm$ 1,8*	32,2 $\pm$ 1,7*
5	4,0 $\pm$ 1,8	30,0 $\pm$ 2,4*	16,8 $\pm$ 1,5*	34,0 $\pm$ 1,8*
6	2,0 $\pm$ 2,2	34,0 $\pm$ 3,3*	19,2 $\pm$ 2,1*	37,2 $\pm$ 1,5*

\*Diferencia significativa entre el grupo tratado y el control ( $p < 0,05$ ).

**Determinaciones bioquímicas.** Todos los grupos tratados presentaron un aumento significativo de la actividad sérica de AST respecto al grupo control ( $43,00 \pm 8,49$  UI L<sup>-1</sup>), siendo especialmente marcado en IcSW+ con valores de  $676 \pm 103,35$  UI L<sup>-1</sup>, siendo estadísticamente diferentes a los obtenidos en los grupos IcSW- ( $343 \pm 17,32$  UI L<sup>-1</sup>) y Ai ( $322 \pm 16,40$  UI L<sup>-1</sup>), lo cual sugiere una mayor intensidad de daño tisular en IcSW+.

La elevación de AST es un hallazgo frecuente en intoxicaciones por plantas que contienen SW (Obeidat

2004, Stegelmeier et al. 2005, Cholich et al. 2021, Oliveira et al. 2021). En este sentido, de Carvalho Nunes et al. (2019) compararon la intoxicación experimental inducida por *A. lentiginosus* (con SW) e *I. carnea* (con SW y calisteginas) en cabras, observando un incremento en la actividad de AST en los grupos tratados en comparación con el control, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. Estos resultados sugieren que, en presencia de SW, las calisteginas no modificarían de manera sustancial la respuesta bioquímica asociada a la toxicidad. No obstante,

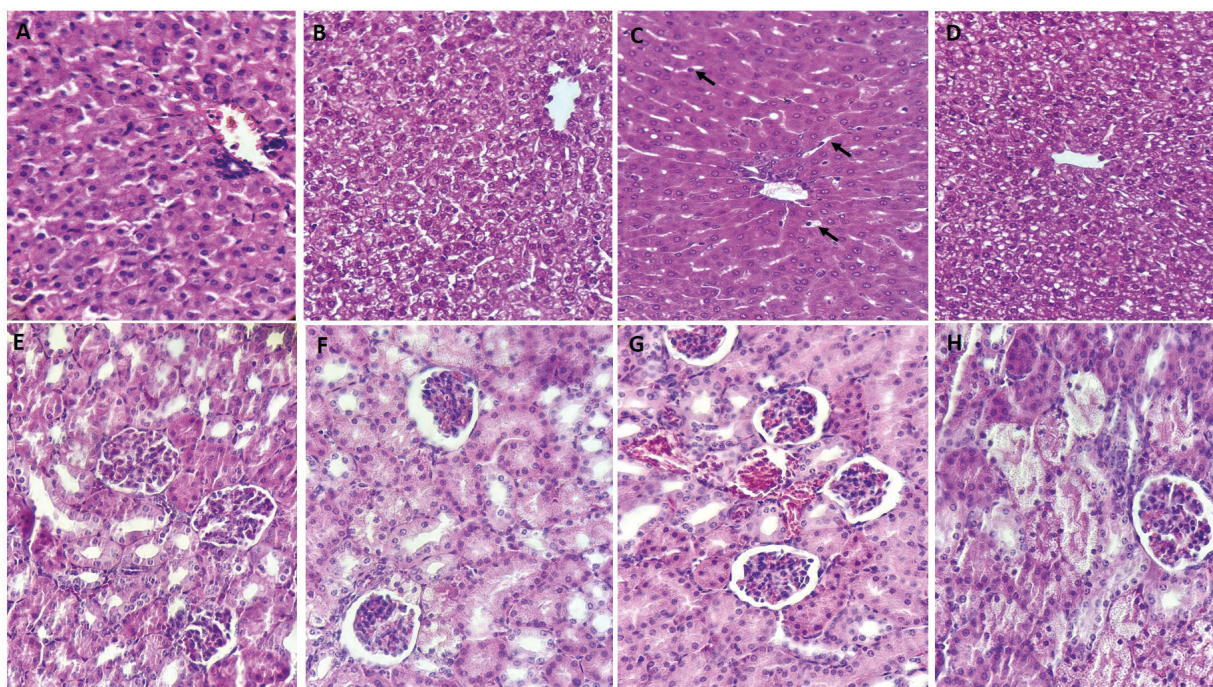
en el presente estudio se evidenció una mayor elevación de AST en el grupo IcSW+, lo que podría atribuirse a una mayor concentración de SW y a la presencia concomitante de calisteginas en comparación con *A. illini*.

**Evaluación histopatológica.** La vacuolización citoplasmática constituye la principal lesión histopatológica en animales intoxicados con plantas que contienen SW, tal y como se ha descrito en diversas especies animales y tejidos (Armién et al. 2007, Cholich et al. 2021). Coincidiendo con estos hallazgos, en el presente estudio se observó vacuolización intracitoplasmática en hepatocitos y células de Kupffer en los tres grupos experimentales, así como en células del túbulo contorneado proximal del riñón. Sin embargo, el tamaño y la extensión de la vacuolización fueron mayor en los grupos que contienen SW (Figura 1). Por otro lado, las lesiones a nivel del SNC fueron observadas particularmente en los grupos IcSW+ y Ai, con vacuolizaciones en plexos nerviosos y en núcleos nerviosos a lo largo del tronco encefálico. Estas lesiones no

fueron observadas en IcSW- ni en el control. El porcentaje de neuronas vacuoladas a nivel del tronco encefálico de los IcSW+ fue de  $30,6 \pm 1,9\%$  y en y Ai de  $6,0 \pm 2,6\%$ .

La distribución y severidad de estas lesiones parecen estar directamente relacionadas con la concentración y duración de la exposición a SW, siendo el riñón uno de los primeros órganos en manifestar alteraciones histológicas, posiblemente debido a su papel en la excreción y su elevada actividad metabólica (Marin et al. 2022). En este sentido, Hueza et al. (2005) trabajaron con extractos acuosos de *I. carnea* y los alcaloides puros (SW y calisteginas), encontrando que las lesiones en ratas fueron más pronunciadas en los grupos tratados con el extracto acuoso en comparación con la SW pura.

En conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que la presencia concomitante de otros compuestos, como las calisteginas, podría potenciar la manifestación de las lesiones inducidas por SW.



**Figura 1.** Cortes histológicas de hígado (A–D) y riñón (E–H) de cobayos controles y de animales que recibieron *Ipomoea carnea* (Ic) con hongo (SW+) y sin hongo (SW–), y *Astragalus illini* (Ai) durante  $40 \pm 5$  días. **A y E:** GI (Control), hígado y riñón con apariencia histológica normal. **B y F, D y H:** GII (IcSW+) y GIV (Ai), respectivamente, se observa marcada vacuolización celular en hepatocitos, células de Kupffer y células tubulares renales. **C y G:** GIII (IcSW–) se evidencia vacuolización de células de Kupffer (flechas) y microvacuolización de células tubulares renales. Tinción H&E: 40X.

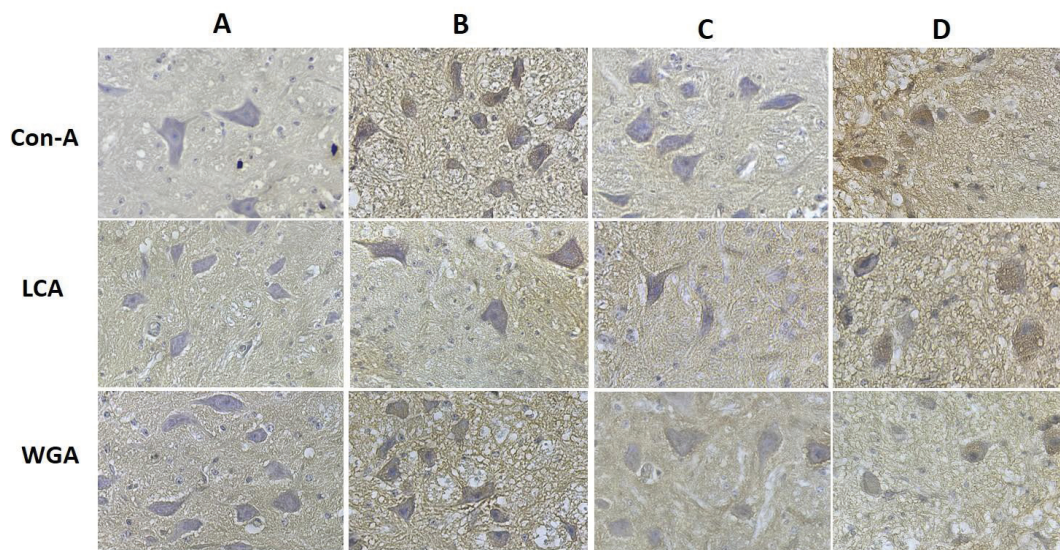
**Lectinhistoquímica.** Los resultados de la lectinhistoquímica en los órganos evaluados se resumen en la Tabla 4. Las células tubulares renales vacuoladas mostraron una reactividad moderada a intensa frente a las lectinas Con-A, WGA y LCA en los tres grupos experimentales, siendo de mayor intensidad en IcSW+ y Ai. La marcación más intensa en el hígado se observó en las células de Kupffer de los grupos IcSW+ y Ai, con fuerte reactividad frente a LCA y WGA, mientras que la reactividad con Con-A fue variable. En IcSW- la tinción fue leve a moderada para LCA y WGA y prácticamente nula con Con-A. En el SNC se evidenció una marcada

tinción en neuronas, plexos y células de Purkinje en los grupos IcSW+ y Ai, particularmente intensa con LCA y WGA. En IcSW-, a través de esta técnica se pudo corroborar la reactividad en las neuronas y células de Purkinje; sin embargo, la marcación fue débil (Figura 2). El estudio confirma la naturaleza del material almacenado en las vacuolas lisosomales de las células afectadas mediante lectinhistoquímica (Cholich et al. 2009). Además, indica una mayor acumulación de residuos glicoconjugados en tejidos de animales expuestos a swainsonina y calisteginas, lo cual se correlaciona con el grado de vacuolización observado histológicamente.

**Tabla 4.** Intensidad de unión de la lectina\* a las células afectadas en órganos de cobayos que recibieron *Ipomoea carnea* (Ic) con (SW+) y sin hongo (SW-), y *Astragalus illini* (Ai) durante  $40 \pm 5$  días.

	GII (IcSW+)			GIII (IcSW-)			GIV (Ai)		
	LCA	WGA	CON-A	LCA	WGA	CON-A	LCA	WGA	CON-A
<b>Riñón</b>	3(0)	3(0)	3(0)	2(0)	2(0)	2(0)	3(0)	3(0)	3(0)
<b>SNC</b>	3(0)	3(0)	3(0)	1(0)	2(0)	1(0)	2(0)	2(0)	3(0)
<b>Hígado</b>	3(0)	3(0)	1(0)	1(0)	1(0)	0(0)	2(0)	2(0)	1(0)

\*LCA: Aglutinina de *Lens culinaris*; WGA: Aglutinina de germen de trigo; CON-A: Concanavalina A. Los números indican la intensidad de la tinción en una escala subjetiva estimada de 0 (no reactivo) a 3 (más reactivo). Los resultados del GI (control) se indican entre paréntesis.



**Figura 2.** Lectinahistoquímica de grupos neuronales del tronco encefálico de cobayos que recibieron *Ipomoea carnea* (Ic) con (SW+) y sin hongo (SW-), y *Astragalus illini* (Ai) durante  $40 \pm 5$  días. A. GI (Control) Neuronas negativas de las lectinas. B, C, D: GII (IcSW+), GIII (IcSW-) y GIV (Ai), respectivamente, se observa de intensidad mediana a alta de las lectinas en las imágenes B y D. La intensidad es baja de las lectinas en las imágenes C. Complejo avidina-biotina. 40X.

Dado que las calisteginas poseen propiedades farmacocinéticas similares a la SW (Dräger 2004), es probable que puedan inducir alteraciones histológicas comparables a los tejidos afectados. Existen evidencias de plantas que contienen exclusivamente calisteginas, como *I. trifida*, e *I. carnea* y algunas especies del género *Solanum*, capaces de ocasionar lesiones neurodegenerativas, en particular vacuolización y pérdida de células de Purkinje (Van der Lugt et al. 2010, Salinas et al. 2019).

En conclusión, los resultados obtenidos confirman la toxicidad tanto individual como combinada de la SW y las calisteginas. Sin embargo, IcSW+ mostró un efecto más severo a nivel hepático, renal y, especialmente, neurológico, en comparación con los otros grupos experimentales que contenían solo uno de estos compuestos. Esto sugiere que la interacción entre ambos alcaloides potencia la toxicidad, incrementando la acumulación de glicoconjugados y la severidad de las lesiones. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de considerar el perfil completo de metabolitos presentes en las plantas tóxicas y no solo la presencia de SW al evaluar el potencial toxigénico de estas hierbas.


**Agradecimientos.** Se agradece al Licenciado Walter Medina del Instituto de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias del Nordeste (UNNE-CONICET) en Corrientes, Argentina, por la identificación taxonómica de las plantas. Este trabajo fue financiado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE; grant N° PI22B007) y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2020/01484).

**Contribuciones de los autores.** GEN: investigación y escritura original. Anahi AK: metodología e investigación. GD: metodología. MA: escritura, revisión y edición. CD: recursos y metodología. CL: análisis formal, revisión y administración del proyecto.

**Conflicto de interés.** Los autores declaran no tener intereses financieros ni relaciones personales que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

**Disponibilidad de datos.** Todos los datos relevantes están dentro del manuscrito y sus archivos de información de apoyo.

## ORCID

García, E.N.  <https://orcid.org/0000-0002-4224-0083>  
 Alucin, A.K.  <https://orcid.org/0009-0000-2720-9419>  
 Gimenez, D.  <https://orcid.org/0009-0005-8378-7041>  
 Martínez, A.  <https://orcid.org/0000-0002-1917-1104>  
 Cook, D.  <https://orcid.org/0000-0001-8568-113X>  
 Cholich, L.A.  <https://orcid.org/0000-0002-7936-8806>

## REFERENCIAS

1. Armién AG, Tokarnia CH, Peixoto PV, Frese K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (*Convolvulaceae*). *Vet. Pathol.* 2007; 44(2): 170-184. <https://doi.org/10.1354/vp.44-2-170>
2. Binaglia M, Baert K, Schutte M, Serafimova R. Overview of available toxicity data for calystegines. *EFSA Journal.* 2019; 17(1): e05574. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5574>
3. Braun K, Romero J, Liddell C, Creamer R. Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweeds. *Mycol Res.* 2003; 107(8): 980-988. <https://doi.org/10.1017/S095375620300813X>
4. Cholich LA, Gimeno E, Teibler PG, Jorge NL, Acosta de Pérez OC. The guinea pig as an animal model for *Ipomoea carnea* induced  $\alpha$ -mannosidosis. *Toxicon.* 2009; 54(3): 276-282. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.04.012>
5. Cholich LA, Márquez M, Batlle MP, Gimeno EJ, Teibler GP, Rios EE, Acosta OC. Experimental intoxication of guinea pigs with *Ipomoea carnea*: Behavioural and neuropathological alterations. *Toxicon.* 2013; 76: 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.062>
6. Cholich LA, Martínez A, Micheloud JF, Pistan ME, García EN, Robles CA, Ortega H, Gimeno EJ. Alpha-mannosidosis caused by toxic plants in ruminants of Argentina. *An Acad Bras Cienc.* 2021; 93: e20191496. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191496>
7. Colodel EM, Gardner DR, Zlotowski P, Driemeier D. Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet Hum Toxicol.* 2002; 44(3): 177-178. PMID: 12046976
8. de Carvalho Nunes L, Stegelmeier BL, Cook D, Pfister JA, Gardner DR, Riet-Correa F, Welch KD. Clinical and pathological comparison of *Astragalus lentiginosus* and *Ipomoea carnea* poisoning in goats. *Toxicon.* 2019; 171: 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.016>
9. Dräger B. Chemistry and biology of calystegines. *Nat Prod Rep.* 2004; 21(2): 211-223. DOI <https://doi.org/10.1039/B300289F>
10. García EN, Aguirre MV, Gimeno EJ, Rios EE, Acosta OC, Cholich LA. Haematologic alterations caused by *Ipomoea carnea* in experimental poisoning of guinea pig. *Exp Toxicol Pathol.* 2015; 67(10): 483-490. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.07.002>
11. Gardner DR, Molyneux RJ, Ralphs MH. Analysis of swainsonine: extraction methods. detection. and measurement in populations of locoweeds (*Oxytropis* spp.). *J Agric Food Chem.* 2001; 49(10): 4573-4580. <https://doi.org/10.1021/jf010596p>
12. Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicol. Pathol.* 2011; 39(1): 22-35. <https://doi.org/10.1177/0192623310389621>
13. Grum DS, Cook D, Baucom D, Mott IW, Gardner DR, Creamer R, Allen JG. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endophyte in the host *Swainsona canescens*. *J Nat Prod.* 2013; 76(10): 1984-1988. <https://doi.org/10.1021/np400274n>
14. Hueza IM, Guerra JL, Haraguchi M, Asano N, Górniak SL. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2005; 57(1): 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.02.004>
15. Huxtable CR, Gibson A. Vacuolation of circulating lymphocytes in guinea-pigs and cattle ingesting *Swainsona galegifolia*. *Dept. of Vet. Path.* 1970. doi: 10.1111/j.1751-0813.1970.tb06685.x
16. Malm D, Nilssen. Alpha-mannosidosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2008; 3: 1-10. doi/10.1186/1750-1172-3-21
17. Marin RE, Gardner DR, Armien AG, Fortunato RH, Uzal FA. Intoxication of llamas by *Astragalus punae* in Argentina. *J Vet Diagn Invest.* 2022; 34(4): 674-678. <https://doi.org/10.1177/10406387221094272>
18. Marin RE, Gardner D, Cook D, Armien AG, Fortunato RH, Riet-Correa F, Uzal FA. Intoxication of sheep by *Astragalus arequipensis* in northwestern Argentina. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2025; 37(2): 375-379. doi.org/10.1177/10406387241311815
19. Martínez A, Robles CA, Roper JM, Gardner DR, Neyaz MS, Joelson NZ, Cook D. Detection of swainsonine-producing endophytes in Patagonian *Astragalus* species. *Toxicon.* 2019; 171: 1-6. doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.020
20. Molyneux RJ, Mckenzie RA, O'Sullivan BM, Elbein AD. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea* sp. Q6 [aff. calobra]) and correlation with toxicity. *Journal of Natural Products.* 1995; 58: 878-886. <https://doi.org/10.1021/np50120a009>
21. Obeidat BS. Effects of locoweeds (*Oxytropis sericea*) consumption and swainsonine exposure on nutrient metabolism of sheep [Doctoral thesis dissertation]. Las Cruces. new mexico: New Mexico State University. 2004.
22. Oliveira CA, Riet-Correa G, Lima E, Medeiros RM, Miraballes C, Pfister JA, Gardner D, Cook D, Riet-Correa F. Toxicity of the swainsonine-containing plant *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* for goats and sheep. *Toxicon.* 2021; 197: 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.013>
23. Pan YT, Ghidoni J, Elbein AD. The effects of castanospermine and swainsonine on the activity and synthesis of intestinal sucrase. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1993; 303(1): 134-144. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1264>
24. Pistán ME, Gutiérrez SA, Schnitger L, Gardner DR, Cholich LA, González AM. Localization of the fungal symbiont (*Chaetothyriales*) in *Ipomoea carnea*. *Botany.* 2022; 100(9): 729-736. <https://doi.org/10.1139/cjb-2022-0033>

25. Pistán ME, Cook D, Gutiérrez SA, Schnittger L, Gardner DR, Cholich LA, González AM. Identification and distribution of a fungal endosymbiotic *Alternaria* species (*Alternaria* section *Undifilum* sp.) in *Astragalus garbancillo* tissues. *Mycologia*. 2024; 116(2): 291-298. <https://doi.org/10.1080/00275514.2023.2299191>
26. Riet-Correa E, Mendez M, SCHILD A. Plantas tóxicas e micotóxicas. Editora e Gráfica Universitaria/UFPEL, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. 2000.
27. Salinas LM, Balseiro A, Jirón W, Peralta A, Muñoz D, Fajardo J, Marín JFG. Neurological syndrome in goats associated with *Ipomoea trifida* and *Ipomoea carnea* containing calystegines. *Toxicon*. 2019; 157: 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.291>
28. Stegelmeier BL, James LF, Gardner DR, Panter KE, Lee ST, Ralphs MH, Spraker TR. Locoweed (*Oxytropis sericea*) Induced lesions in mule deer (*Odocoileus hemionus*). *Veterinary pathology*. 2005; 42(5): 566-78. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-566>
29. Stegelmeier BL, Molyneux RJ, Asano N, Watson AA, Nash RJ. The comparative pathology of the glycosidase inhibitors swainsonine, castanospermine, and calystegines A3, B2, and C1 in mice. *Toxicol Pathol*. 2008; 36(5): 651-9. <https://doi.org/10.1177/0192623308317420>
30. Van der Lugt JJ, Bastianello SS, Van Ederen AM, Van Wilpe E. Cerebellar cortical degeneration in cattle caused by *Solanum kwebense*. *Vet J*. 2010 185(2):225-227. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.012>