

PRINCIPIOS TOXICOS DE SOLANUM MALACOXYLON SENDTNER. I. ACCION DE FRACCIONES SEPARADAS POR EXTRACCION CON SOLVENTES SELECTIVOS SOBRE EL METABOLISMO FOSFO-CALCICO Y TEJIDOS BLANDOS DEL CONEJO.

* B. K. Cassels, ** F. M. Rossi, M. E. Dallorso, H. Daskal y A. Leiva.

RESUMEN. Se separaron seis fracciones químicamente diferentes de hojas de *Solanum malacoxylon* Sendtner por extracción con solventes selectivos, y se ensayó la acción de estas fracciones sobre el metabolismo de calcio y fósforo en conejos. Dos de estas fracciones elevaron los niveles de fósforo inorgánico en sangre y produjeron calificaciones en tejidos blandos; su composición indica que el efecto metabólico debe atribuirse a glicósidos, mono u oligosacáridos, aminoácidos u oligopéptidos.

SUMMARY. Six chemically distinct fractions of *Solanum malacoxylon* Sendtner leaves were separated by selective solvent extraction, and the effects of these fractions on calcium and phosphorus metabolism were assayed in rabbits. Two of these fractions raised serum phosphate levels and produced calcified lesions in soft tissues; the composition of these fractions suggests that the metabolic effect should be attributed to glycosides, mono - or oligosaccharides, amino acids or oligopeptides.

* Laboratorio Central de Química, Universidad Técnica del Estado, Santiago

** División Agropecuaria, Gerencia de Investigación, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCION

El *Solanum malacoxylon* Sendtner (SM) es una planta frecuente en terrenos anegadizos de la provincia de Buenos Aires (República Argentina) cuya ingestión provoca en rumiantes una enfermedad conocida con el nombre local de "enteque seco", caracterizada por la formación de depósitos masivos de sales de calcio en tejidos blandos y aumento del producto $Ca \times P$ sérico (1,2). Estas alteraciones han sido reproducidas experimentalmente en bovinos (1,2), ovinos (3,4), cuyes (5,6) y conejos (7, 8,9) administrando por vía oral extractos acuosos (EA) de hojas de SM. En conejos y cuyes la calcemia no sufrió cambios estadísticamente significativos, pero la fosfatemia aumentó significativamente. En conejos se observó una disminución simultánea de los niveles de fosfatasa alcalina en plasma, hecho que parecería indicar una inhibición de la formación ósea.

El presente trabajo es una contribución preliminar a la identificación de los compuestos responsables de la acción del SM sobre el metabolismo fosfocálcico y los tejidos blandos del conejo. Este animal responde en forma precoz a la administración de SM, con respuestas séricas y tisulares características. Por tal motivo se le utilizó en el presente trabajo, que tiene por objeto reconocer la presencia de sustancias que causan hiperfosfatemia/hipercalcemia y calcificación de tejidos blandos en fracciones separadas del SM por extracción con solventes selectivos.

MATERIAL Y METODOS

Se partió de 250 g de hojas secas molidas que se extrajeron exhaustivamente en Soxhlet, primero con éter de petróleo (60 - 70°) y después con benceno, para eliminar compuestos poco polares (principalmente cera, grasas y pigmentos) que pudieran dificultar el fraccionamiento posterior y que, dada su insolubilidad en agua no podrían formar parte del extracto acuoso, que contiene los compuestos tóxicos.

El polvo de planta extraído con éter de petróleo y con benceno se secó al aire y se agotó nuevamente en Soxhlet, esta vez con metanol (Tabla I), obteniéndose una solución que se concentró a presión reducida hasta obtener una pasta de color café. Después de secar una vez más el polvo de planta agotado con metanol, se le suspendió en agua destilada dejándolo en maceración a temperatura ambiente durante 24 horas, se filtró y lavó; el filtrado y las aguas de lavado se liofilizaron constituyendo la fracción A, que fue sometida a ensayos biológicos sin fraccionamiento ulterior.

El residuo de evaporación del extracto metanólico se disolvió fácilmente en 250 ml de HCl 1N, y la solución ácida se extrajo con cloroformo (dos veces con 100 ml y una vez con 50 ml), dando una fase clorofórmica B y una fase acuosa C. El extracto clorofórmico B fue extraído a su vez con NaOH 1N (dos veces con 100 ml y una vez con 50 ml), dando una fase clorofórmica B₁ y una fase acuosa B₂. La fase clorofórmica B₁ se evaporó a sequedad y su residuo, disuelto en agua, fue ensayado en conejos. La fase acuosa B₂ se acidificó con HCl concentrado hasta una concentración de ácido 1N y se extrajo como antes con cloroformo, dando una fase clorofórmica B₃ y una fase acuosa B₄. La fase B₃ y la B₄ (previamente neutralizada con NaOH) se evaporaron a sequedad, y las soluciones acuosas de los residuos se sometieron a ensayos biológicos.

La solución acuosa ácida C se alcalinizó con NaOH hasta una concentración de base 1N y se extrajo con cloroformo de la manera ya descrita, para dar una fase clorofórmica C₁ y una fase acuosa C₂. La fase C₁ y la C₂ (previamente neutralizada con HCl) se evaporaron a sequedad y las soluciones acuosas de los residuos se sometieron a ensayos biológicos.

Para probar la actividad biológica de cada fracción se usaron lotes de 6 - 7 co-

nejos albinos de 1800 g peso promedio. Cada lote (Tabla II) recibió en total cuatro dosis de una sola fracción (Lotes I a VI). Cada dosis diaria equivalió a 250 mg de hoja seca de SM. Otro lote (Lote EA) recibió dosis análogas de extracto acuoso de SM. (7) El lote testigo (Lote T) fue mantenido en idénticas condiciones de alimentación (alimento concentrado comercial para conejos y agua *ad libitum*) que los anteriores.

24 horas después de la primera dosis se extrajo sangre a todos los conejos experimentales, por sangría auricular. 24 horas después de la cuarta dosis se sangraron todos los conejos a blanco y se extrajeron riñones, aortas, pulmones y estómagos (región fúndica), que fueron procesados histológicamente según técnicas ya descritas. (7) Todas las muestras de sangre fueron procesadas según la técnica de Fiske y Subbarow para P (10) y la de Clark y Collip para Ca. (11).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla II.

La fosfatemia de los conejos que recibieron fracción A (Lote I) y fracción C₂ (Lote VI), sufrió un aumento significativo después de la primera dosis. Dicho aumento se observó hasta el fin de la experiencia, después de administradas cuatro dosis. La calcemia de estos dos lotes no aumentó significativamente. En ambos lotes se observaron deposiciones cálcicas renales (vasos arteriales corticales, túbulos contorneados), aórticas (túnica media, desde limitante elástica interna), pulmonares (epitelio y corion de la mucosa bronquial/bronquiolar) y gástricas (mucosa glandular, arterias del plexo mucoso). La incidencia de lesiones fue del 100% de los órganos examinados.

Los conejos que recibieron EA de SM (Lote EA) respondieron en forma similar a los Lotes I y VI: aumento significativo y sostenido de la fosfatemia, hipercalcemia inicial y depósitos cálcicos en riñón, aorta, pulmón y estómago después de la cuarta dosis. Esta respuesta de los conejos al tratamiento con SM es análoga a la ya descrita en otras ocasiones. (8,9)

Los conejos que recibieron fracciones B₁, B₃, B₄ y C₁ no presentaron modificaciones en su fosfatemia ni en su calcemia, comparadas con los niveles basales de los conejos testigos. Tampoco se presentaron deposiciones cálcicas en los órganos de los conejos pertenecientes a estos lotes o en los testigos.

CONCLUSIONES

La marcha de separación (Tabla I) permitió obtener seis fracciones cuyos componentes principales son:

- A : compuestos solubles en agua pero poco solubles en metanol, muy polares (sales inorgánicas, aminoácidos, péptidos, proteínas, mono-, oligo- y polisacáridos, glicósidos).
- B₁: compuestos neutros solubles en metanol y extraíbles con cloroformo, poco polares (restos de lípidos y pigmentos).
- B₃: compuestos ácidos solubles en metanol y extraíbles con cloroformo, poco polares (ácidos carboxílicos, fenoles monofuncionales).
- B₄: compuestos ácidos solubles en metanol y extraíbles con cloroformo, medianamente polares (ácidos carboxílicos y fenoles polifuncionales).

- C₁: compuestos básicos solubles en metanol y extraíbles con cloroformo, poco polares (alcaloides no glicosídicos ni cuaternarios).
- C₂: compuestos solubles en metanol y no extraíbles con cloroformo, muy polares (bases cuaternarias, aminoácidos y oligopéptidos, mono - y oligosacáridos, glicosídicos).

Los ensayos biológicos permitieron determinar que sólo las fracciones A y C₂ elevan la fosfatemia (con aumento del producto Ca x P) y producen deposiciones cálcicas características en aorta, estómago, riñón y pulmón.

De estos resultados se deduce que los principios biológicamente activos del SM, que provocan el aumento del producto Ca x P sérico y la calcificación de ciertos tejidos blandos en el conejo, aparecen en concentraciones apreciables en estas dos fracciones solamente, y por lo tanto deben ser glicosídicos, aminoácidos, oligopéptidos, mono - u oligosacáridos.

La etapa siguiente del trabajo deberá aclarar a cuál de estos tipos de compuestos químicos pertenecen.

Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento a las autoridades de la 2a. Cátedra de Histología de la Facultad de Medicina (Universidad de Buenos Aires) y a las del Instituto de Investigaciones médicas de dicha Facultad por el valioso asesoramiento y colaboración prestados para el desarrollo y realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Carillo, B.J. y Worker, N.A., Rev. Invest. Agropecuar. Ser. 4. Patología Animal, 4, 9 (1967).
2. Worker, N.A. y Carillo, B.J., Nature 215, 72 (1967).
3. Camberos, H.R. y Davis, G.K., A.L.P.A. Mem. 3, 31-39 (1969).
4. Gaggino, O.P., Rev. Invest. Agropecuar. Ser. 4, Patología Animal, 6, 31-40 (1969).
5. Camberos, H.R., Davis, G.K., Djafar, M.I., Simpson, C.F., Am. J. Vet. Res., 31, 685-696 (1970).
6. Camberos, H.R. y otros, Medicina 29, 441 (1969).
7. Rossi, F.M., Dallorso, M.E., Daskal, H., Leiva, A. y Gaggino, O.P., Gaceta Veterinaria (Buenos Aires) 31, 415-426 (1969).
8. Mautalen, C.A., y otros, Medicina 29, 442 (1969).
9. Rossi, F.M., y otros, Medicina 29, 443 (1969).
10. Fiske, C.H. y Subbarow, Y., J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
11. Clark, E.P. y Collip, J.B., J. Biol. Chem. 63, 461 (1925).

TABLA I

250 g SOLANUM MALACOXYLON SECO MOLIDO

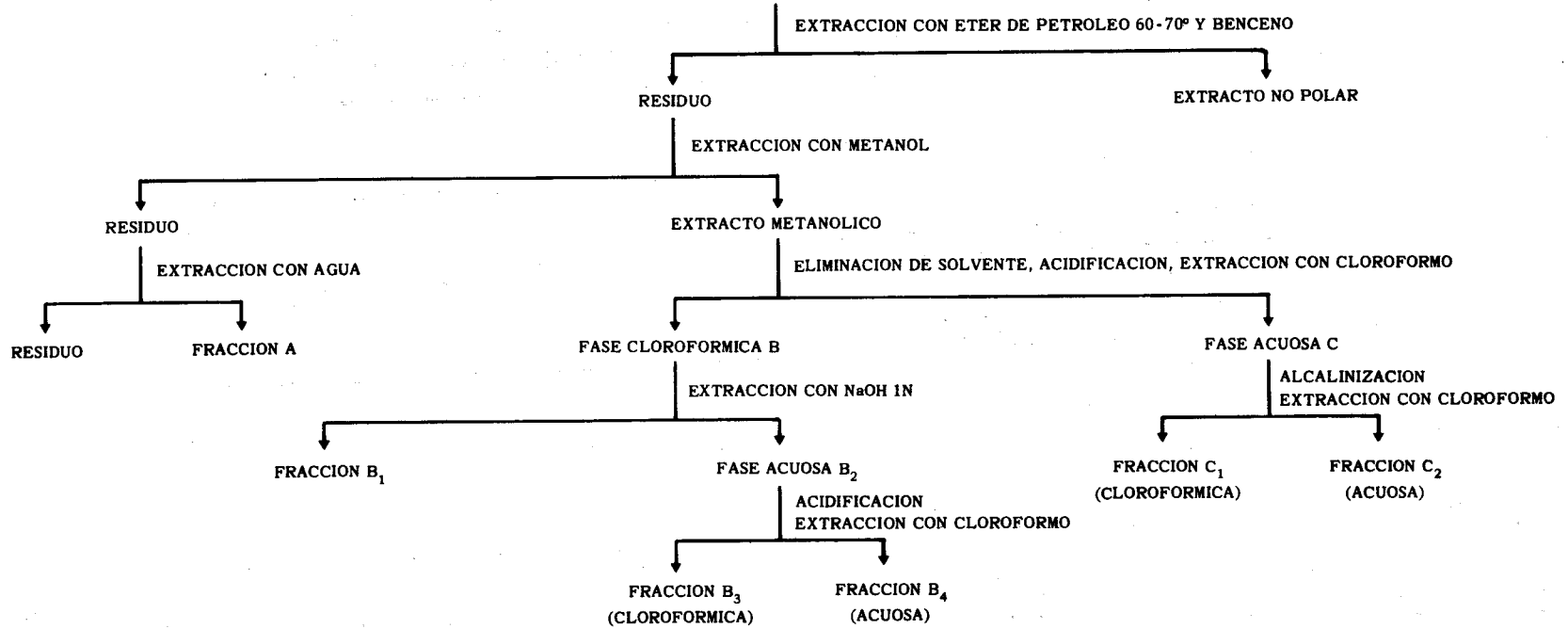


TABLA II

LOTE	FRACCION	NUMERO DE ANIMALES	FOSFATEMIAS (mg %)		CALCEMIAS (mg %)		LESIONES			
			1 DOSIS	4 DOSIS	1 DOSIS	4 DOSIS	RENALES	AORTICAS	PULMONARES	GASTRICAS
I	A	7	p < 0,01 9,91±0,44	p < 0,001 8,30±0,10	p > 0,1 16,06±0,40	p > 0,8 15,3±0,96	+	+	+	+
II	B ₁	6	p > 0,7 5,63±0,11	p > 0,8 5,4±0,57	p > 0,8 14,84±0,68	p > 0,05 15,88±0,16	-	-	-	-
III	B ₃	6	p > 0,8 5,58±0,11	p > 0,8 5,48±0,25	p > 0,6 14,54±0,75	p > 0,5 15,63±0,79	-	-	-	-
IV	B ₄	7	p > 0,7 5,38±0,25	p > 0,5 5,33±0,27	p > 0,4 14,33±0,79	p > 0,5 15,5±0,64	-	-	-	-
V	C ₁	7	p > 0,9 5,55±0,11	p > 0,5 5,74±0,06	p > 0,5 15,33±0,20	p > 0,3 14,58±0,09	-	-	-	-
VI	C ₂	6	p < 0,001 9,14±0,08	p < 0,01 7,60±0,53	p > 0,3 15,98±0,77	p > 0,3 16,20±1,15	+	+	+	+
EA	EA	4	p < 0,001 9,09±0,13	p < 0,001 9,06±0,34	p > 0,3 16,05±0,69	p > 0,1 15,72±0,08	+	+	+	+
T	-	9	5,59 ± 0,35		15,05 ± 0,38		-	-	-	-