

# Potencial toxigénico de *Astragalus pehuenches* Niederl en Argentina

MARTÍNEZ, A.<sup>1</sup>; GARDNER, D.R.<sup>2</sup>; COOK, D.<sup>2</sup>; GIMENO, E.J.<sup>3</sup>; ROBLES, C.A.<sup>1</sup>

## RESUMEN

El género *Astragalus* está ampliamente distribuido en el mundo y algunas especies son tóxicas para el ganado. En Argentina, *Astragalus pehuenches* ha sido incriminado históricamente en casos de intoxicación en ovinos, bovinos y equinos. Debido a la escasa información sobre los aspectos toxicológicos de la especie, se llevó a cabo un estudio con el fin de evaluar el potencial toxigénico de *A. pehuenches* en la provincia de Río Negro. A nivel regional se determinaron altas concentraciones de swainsonina de 0,070 y 0,097%. Si bien no se encontraron diferencias del potencial toxigénico entre zonas de cosechas ( $p=0,277$ ), se observó una alta variación de las concentraciones de swainsonina entre especímenes (rango: 0,001-0,204%). A partir de este trabajo se confirma el riesgo que constituye esta especie para el ganado de la región patagónica.

**Palabras clave:** *Astragalus pehuenches*, toxicidad, ganado, Patagonia argentina.

## ABSTRACT

The genus *Astragalus* is widespread over the world being some toxic to livestock. *Astragalus pehuenches* has historically been incriminated in poisoning sheep, cattle and horses in Argentina. Due to the lack of information on the toxicological aspects of this species, a study was carry out to evaluate the toxigenic potential of *A. pehuenches* in Rio Negro province. High concentrations of swainsonine from 0.070 to 0.097% were determined in this region. Swainsonine concentrations was highly variable between specimens (range: 0.001-0.204%), however no differences were found regarding the toxigenic potential between areas ( $p=0.277$ ). This study confirms the risk that this species it constitutes for livestock in Patagonia region.

**Keywords:** *Astragalus pehuenches*, toxicity, livestock, Patagonia argentina.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Grupo de Salud Animal. CC. 277 (8400) SC de Bariloche, Argentina. Correo electrónico: martinez.agustin@inta.gob.ar

<sup>2</sup>USDA/ARS Poisonous Plant Research Laboratory, 1150 East 1400 North, Logan, Utah 84341.

<sup>3</sup>Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Patología, La Plata, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

El género *Astragalus* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo con más de 2500 especies en todos los continentes, excepto Oceanía y Antártida (Gómez-Sosa, 1979; Instituto Darwinion, 2014). En América del Sur, con un total de 110 especies, este género se encuentra desde Ecuador hasta Argentina y Chile (Gómez-Sosa, 1979; Gómez-Sosa, 2010). Se postulan dos orígenes de *Astragalus*, uno del viejo mundo constituido por especies Euroasiáticas y otro, denominado Neo-*Astragalus* originario del continente americano. Las especies de *Astragalus* de América del Sur se subdividen en dos clados denominados *F* y *G* (Scherson *et al.*, 2008). En Argentina, el género *Astragalus* está representado por 70 especies endémicas, tanto del clado *F* que se distribuyen principalmente sobre el oeste del país desde la provincia de Jujuy hasta Tierra del Fuego, como del clado *G* que se distribuyen hacia el centro-este del territorio nacional (Gómez-Sosa, 1979; Scherson *et al.*, 2008; Instituto Darwinion, 2014).

*Astragalus pehuenches* Niederl es una de las especies argentinas perteneciente al clado *G* que ha sido incriminada como responsable de intoxicaciones en el ganado (Gómez-Sosa, 1979; Kauffery y Heinken, 1984; Robles *et al.*, 2000). Al igual que otras 70 especies, la toxicidad de *A. pehuenches* está dada por la presencia de un alcaloide denominado swainsonina (SW) (Molyneux y Sosa, 1991; Cook *et al.*, 2017). Este alcaloide es un potente inhibidor de la enzima  $\alpha$ -manosidasa lisosomal, la cual es responsable de la metabolización de las glicoproteínas a nivel celular. Debido a la inhibición, los oligosacáridos no pueden ser correctamente metabolizados y se acumulan dentro del lisosoma (Moremen, 2002). Si bien esta alteración es sistémica, la sintomatología de los animales intoxicados se caracteriza principalmente por presentar signos nerviosos expresados por dificultad en el desplazamiento con ataxia, disimetría e incoordinación (Jolly y Walkley, 1997).

La primera evidencia de toxicidad de *Astragalus pehuenches* en Argentina, se obtuvo a partir de la detección de niveles tóxicos de SW en dos ejemplares herborizados provenientes de las provincias de Mendoza y Chubut (Molyneux y Gómez-Sosa, 1991). Años después se reportó el primer brote de intoxicación natural en Argentina ocurrido en la provincia de Río Negro que afectó al 73% de una majada de 300 ovinos (Robles *et al.*, 2000) y desde entonces recurrentemente se reciben consultas por casos de intoxicación en equinos, ovinos y bovinos por parte de productores de las provincias de Río Negro y Chubut (Martínez y Robles, 2016).

Por muchos años se creyó que la SW era un metabolito secundario de la planta, sin embargo en el 2003 se descubrió que es producida por hongos endófitos del género *Alternaria* clase *Undifilum spp.* que conviven en simbiosis con algunas especies de *Astragalus* (Braun *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2011). A partir de este descubrimiento, la relación endófito-planta ha sido estudiada en especies norteamericanas y asiáticas (Cook *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010).

Dada la importancia que tiene esta intoxicación en la región Patagónica y la escasa información sobre los as-

pectos toxicológicos del género en la Argentina, se llevó a cabo un primer estudio con el fin de evaluar el potencial toxigénico de *Astragalus pehuenches* en la provincia de Río Negro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área bajo estudio

El estudio se llevó a cabo en la provincia de Río Negro en un área que comprende a las localidades de Los Menucos, Maquinchao e Ingeniero Jacobacci. El área abarcada es ambientalmente caracterizada como de transición entre las áreas ecológicas de sierras y mesetas occidentales y monte austral (figura 1). En dicha región, histórica y frecuentemente, se presentan casos de intoxicación por *Astragalus pehuenches* en el ganado. Para los fines del estudio el área se subdividió en tres zonas comprendiendo establecimientos ganaderos aledaños a las tres localidades antes citadas.

### Muestreos de *Astragalus pehuenches*

Con el fin de caracterizar la distribución y potencial toxigénico de *Astragalus pehuenches* en la región, se colectaron plantas durante el mes de enero de 2012 y 2013. Para ello se visitaron establecimientos ganaderos donde había registros de presencia de la planta. En cada establecimiento, se recabó información al productor sobre el historial de casos de intoxicación. Finalmente, se realizó la cosecha de las plantas recorriendo los cuadros de pastoreo del establecimiento, recolectándose ejemplares enteros mediante un corte con tijera sobre la corona a 1 cm del suelo. El material verde colectado se pesó y se procesó separando manualmente los tallos (T) de las hojas, flores, frutos y semillas (HFFS). Para el análisis toxicológico se analizaron muestras según (1) partes de la planta (T y HFFS), (2) zona de cosecha (Los Menucos, Maquinchao e Ing. Jacobacci) y (3) años de estudio (2012 y 2013). Para determinar la concentración de SW de la región, cada año se confeccionó una muestra correspondiente a la mezcla de las tres zonas de cosecha. El material molido restante se utilizó como insumo para ensayos experimentales de la intoxicación en cobayos y ovinos.

Con el fin de evaluar si existen diferencias en la concentración de SW según zona de la región, se llevó a cabo un muestreo sistemático ajustándose a las metodologías de muestreo propuestas por Gardner *et al.* (2001) y Cook *et al.* (2014). Para ello en cada zona de cosecha se colectaron entre siete y ocho especímenes enteros de *Astragalus pehuenches* los cuales fueron procesados y analizados en forma individual. En total se muestrearon 23 especímenes.

El material vegetal provenientes de los dos muestreos fue secado en estufa a 58 °C y triturado con un molino vertical utilizando un tamiz de 1 mm. La molienda obtenida se guardó en envases herméticos, al resguardo de la luz solar y humedad hasta el momento de las determinaciones de SW.

Un espécimen entero fue prensado en papel y enviado al Herbario de la Facultad Ciencias Agronómicas y Forestales de la UNLP, para la identificación botánica y herborización.

### Determinación de swainsonina (SW)

Las muestras del material cosechado en las colectas de los dos años y de los 23 especímenes muestreados individualmente fueron analizadas para la detección y cuantificación de SW mediante la metodología propuesta por Gardner y Cook (2011). Brevemente, la extracción de los alcaloides se realizó a partir de 50 mg de planta molida y 1,5 mL de ácido acético en continua agitación por 16 h. Una fracción de extracto del ácido acético (100 µL) se mezcló con una solución de hidróxido de amonio (900 µL). Las muestras se procesaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS). Los valores de SW se expresaron en porcentaje de SW por peso de materia seca de planta.

### Análisis estadístico

Para determinar diferencias en las concentraciones de SW según zona de cosecha se realizó un ANOVA mediante el Software MedCalc® Versión 11.3.1.0. Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### Identificación y caracterización de la planta

El ejemplar enviado para identificación botánica fue clasificado como: *Astragalus pehuenches* Niederl. (Familia

Leguminosa). Nombre vernáculos: “Yerba Loca” o “Garbancillo”.

En los dos años de estudio y en las fechas de muestreo se encontraron poblaciones de *A. pehuenches* en rebrote, florecido, fructificado y lignificado. Estos diferentes estados fenológicos se observaron en forma simultánea (figura 2). Los tamaños de las plantas variaron entre 10 y 50 cm de alto y se encontraron en suelos removidos y bordes de mallín. En el primer año se colectaron 29,5 kg y en el segundo año cuando se recorrieron un mayor número de establecimientos, se colectaron 81,6 kg de planta verde.

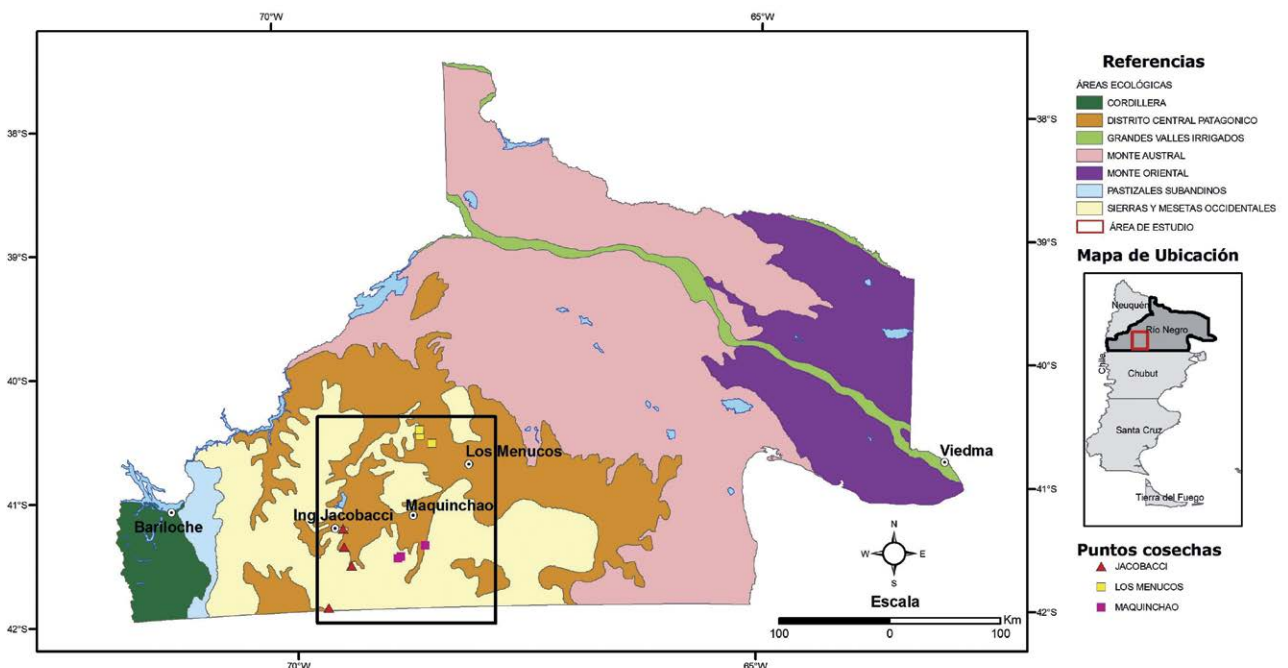
### Concentración de SW en *Astragalus pehuenches*

En la tabla 1 se pueden observar los detalles de cosechas y los valores de swainsonina a nivel regional para los dos años de estudio.

Los promedios zonales, el desvío estándar y el rango de la concentración de swainsonina en los especímenes cosechados en el muestreo sistemático se presentan en la tabla 2. Las concentraciones de swainsonina no difirieron significativamente según zona de cosecha ( $p = 0,277$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se confirmó la presencia de *Astragalus pehuenches* en una superficie de 23.400 km<sup>2</sup> en la región sur de la provincia de Río Negro. El crecimiento de la planta se observó en terrenos entre los 950 y 1200



**Figura 1.** Mapa de la provincia de Río Negro y sus áreas ecológicas, indicando el área de colecta de los especímenes de *Astragalus pehuenches* (recuadro).





**Figura 2.** (A) Especímen de *Astragalus pehuenches* de gran tamaño. (B) Inflorescencia violácea y (C) frutos globosos característicos de *Astragalus pehuenches*.

m s. n. m., generalmente ajustándose a un patrón de distribución por manchones, en áreas de peri mallín, pampas arenosas y en lugares donde el suelo en algún momento fue removido, coincidiendo con lo reportado por Gómez-Sosa (1979).

El único reporte existente sobre la detección de swainsonina en *A. pehuenches*, fue realizado solo sobre dos ejemplares herborizados y analizados mediante la técnica de cromatografía gaseosa (GC) donde se obtuvieron concentraciones de SW de 0,028 y 0,034% MS (Molyneux y Gómez-Sosa, 1991), valores inferiores a los hallados en este trabajo. En el presente estudio se utilizó la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS), una técnica que posee mayor sensibilidad para determinar la concentración de SW comparada con técnicas como GC, cromatografía en placa delgada y con la inhibición enzimática (Gardner *et al.*, 2001). Este trabajo es el primer estudio toxicológico en poblaciones de *A. pehuenches* realizado sobre especímenes de campo, donde utilizando LC-MS se establecieron valores entre 0,070 a 0,097%, lo cual se ajustaría al verdadero potencial toxigénico de la especie en la región.

Las concentraciones de SW en *Astragalus pehuenches* de la región fueron entre 70 a 100 veces superiores al umbral de toxicidad considerado en 0,001% (Molyneux *et al.*, 1995). Este hecho pone en evidencia que las poblaciones de *A. pehuenches* de la región poseen un alto potencial toxigénico y por ende constituyen un riesgo de intoxicación para el ganado que pastorea en dichas áreas. A pesar de esto, los productores con los que se trabajó comentaron que tanto en el año 2012 como en el 2013 no registraron casos clínicos en su ganado, lo cual demuestra que además del alto potencial toxicológico de la planta tienen que existir otros factores que favorezcan la aparición de brotes como podrían ser el sobrepastoreo de los campos, baja oferta forrajera en algún momento del año y aumento de la población anual de *Astragalus* en años lluviosos (Gardner *et al.*, 2001). Estos factores favorecerían que los animales consuman plantas de *Astragalus* que, además de ser relativamente palatables, suelen rebrotar antes que el pastizal acompañante, aumentando así su preferencia por parte del ganado (Ralphs *et al.*, 2002).

Utilizando *Oxytropis sericea*, Stegelmeier *et al.* (1999) sugirieron que los ovinos se intoxican con una dosis diaria

Zona	Coordenadas	Parte planta	Swainsonina % MS	
			2012	2013
Los Menucos	40°33'18.6S 68°36'08.9° O	H-F-F-S	0,12	0,102
	1197 m s. n. m.	Tallos	0,07	0,055
Maquinchao	41°29'55.5 S 68°34'38.6° O	H-F-F-S	0,08	0,122
	979 m s. n. m.	Tallos	0,04	0,066
Ing. Jacobacci	41°58'24.3 S 69°38'42.3° O	H-F-F-S	0,06	0,149
	1069 m s. n. m.	Tallos	0,04	0,074

**Tabla 1.** Concentración de swainsonina en muestras de plantas de *Astragalus pehuenches*, discriminados según parte de la planta, colectadas en tres zonas de la provincia de Río Negro en los dos años de estudio. Ref.: H-F-F-S: Hojas-Flores-Frutos-Semillas.

Zona	N.º plantas	Swainsonina (Promedio %MS ± DE)	Rango (% MS)
Los Menucos	7	0,128±0,016 <sup>a</sup>	0,065 - 0,204
Maquinchao	8	0,089±0,022 <sup>a</sup>	0,001 - 0,174
Ing. Jacobacci	8	0,114±0,011 <sup>a</sup>	0,070 - 0,153

**Tabla 2.** Promedio, desvío estándar (DE) y rango de la concentración de swainsonina en las tres zonas de estudio. % MS: Porcentaje de SW por peso de materia seca de planta. (ª): Promedios identificados por la misma letra representan diferencias no significativas.

de de 0,2 mg SW/kg por un periodo de 30 días. Si contemplamos las concentraciones de SW en *A. pehuenches* observadas en este estudio, podríamos decir que un ovino Merino a campo se intoxicaría si consumiera diariamente entre 90 y 150 gramos de planta por un periodo de 30 días.

La metodología utilizada para estimar el potencial toxigénico podría replicarse en otras especies de *Astragalus* en las que ya se ha detectado SW, como por ejemplo *Astragalus garbancillo* var *garbancillo* en el noroeste argentino (Micheloud *et al.*, 2017) y *Astragalus illinii* en la Patagonia argentina (Martinez, datos no publicados), como así también en otras especies de *Astragalus* de Sudamérica las cuales contienen SW (Cook *et al.*, 2017). Para llevar a cabo estos estudios, sería oportuno que laboratorios especializados del país pongan a punto las técnicas cromatográficas necesarias para la determinación del tóxico.

En cuanto a la distribución de la SW, se comprobó que se encuentra en toda la parte aérea de la planta, sin embargo la concentración de la toxina no fue homogénea. Coincidiendo con reportes previos (Cook *et al.*, 2011), se determinó que las hojas, flores, frutos y semillas tenían prácticamente el doble de la concentración de SW que los tallos, tal como se observa en la tabla 1.

Por una parte, en el presente trabajo no se hallaron diferencias significativas en la concentración de SW entre poblaciones de *A. pehuenches* en las tres zonas. Posiblemente esto se deba a que, si bien las zonas abarcadas estaban separadas por más de 50 km, eran homogéneas tanto ambiental, climática como geográficamente (Bran *et al.*, 2000), con lo cual no permitió diferenciarse una de otra. Por otra parte, la alta variabilidad de la concentración de SW podría dificultar la diferenciación entre zonas. Además, esta variabilidad estaría sujeta a la cantidad y metabolismo del hongo endófito (Cook *et al.*, 2009).

En la actualidad se están realizando estudios para aislar y tipificar los hongos endófitos presentes en *Astragalus pehuenches*, de esta forma se podrá a futuro caracterizar la dinámica del potencial toxigénico y correlacionarlo con los principales factores tanto bióticos como abióticos que podrían condicionar la variación del potencial toxigénico de la planta en la región.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado por proyectos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

PNSA 1115055 “Enfermedades infecciosas, parasitarias y tóxicas que afectan la productividad de los ovinos, caprinos y camélidos”, PRET 1281102 “Aportes a la recuperación y desarrollo territorial del semi-árido Sur de la Provincia de Río Negro”, y de la Universidad Nacional de La Plata (Proyecto: 11/V232) y subsidio del FONCyT PICT-2011-1379 “Neuropatología veterinaria básica y aplicada en intoxicaciones inducidas por plantas tóxicas”. Agradecemos la colaboración de Rocío Alvarez, Virginia Velasco y Fernando Umaña por la asistencia técnica, colecta de las plantas y confección del mapa. Al Dr. Néstor Bayón (FCAYF UNLP) por la identificación y herborización del material colectado.

## BIBLIOGRAFÍA

- BRAN, D.; AYESA, J., LÓPEZ, C. 2000. Regiones ecológicas de Río Negro. INTA EEA Bariloche Comunicación Técnica de Relevamiento Integrado 59, p. 8.
- BRAUN, K; ROMERO, J.; LIDDELL, C.; CREAMER R. 2003. Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. *Mycological Research*. 107: 980–988.
- COOK, D.; GARDNER, D.R.; RALPHS, M.H.; PFISTER, J.A.; WELCH, K.D.; GREEN, B.T. 2009. Swainsonine concentrations and endophyte amounts of *Undifilum oxytropis* in different plant parts of *Oxytropis sericea*. *Journal of Chemistry Ecology*. 35, 1272-1278.
- COOK, D.; GARDNER, D.R.; GRUM, D.; PFISTER, J.A.; RALPHS, M.H.; WELCH, K.D.; GREEN, B.T. 2011. Swainsonine and endophyte relationships in *Astragalus mollissimus* and *Astragalus lentiginosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:1281-1287.
- COOK, D.; GARDNER, D.R.; PFISTER, J.A. 2014. Swainsonine-containing plants and their relationship to endophytic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 7326-7334.
- COOK, D.; GARDNER, D.R.; LEE, S.T.; PFISTER, J.A; STONE-CIPHER, C.A.; WELSH, S.L. 2016. A swainsonine survey of North American *Astragalus* and *Oxytropis* taxa implicated as locoweeds. *Toxicon* 118: 104-111.
- COOK, D.; GARDNER, D.R.; MARTINEZ, A.; ROBLES, C.; PFISTER, J.A. 2017. A screen for swainsonine among South American *Astragalus* Species. *Toxicon*. 145: 154-156.
- GARDNER, D.R.; MOLYNEUX, R.J.; RALPHS, M.H. 2001. Analysis of swainsonine: extraction methods, detection, and measurement in populations of locoweeds (*Oxytropis* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4573-4580.
- GARDNER, D.R.; COOK, D.A. 2011. A comparison of alternative sample preparation procedures for the analysis of swainsonine using LC-MS. *Phytochemistry Analysis*. 22: 124-127.
- GÓMEZ-SOSA, E. 1979. Las especies sudamericanas del género *Astragalus* (Leguminosae). Las especies patagónicas argentinas. *Darwiniana*, 22: 313-376.

- GÓMEZ-SOSA, E. 2010. Nueva especie del género *Astragalus* (Leguminosae, Galegeae) para Perú. *Darwiniana*. 48:1-6.
- INSTITUTO DARWINION. 2014. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. (Disponible: [www.darwin.edu.ar/http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm](http://www.darwin.edu.ar/http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm) verificado: diciembre de 2014).
- JOLLY, R.D.; WALKLEY, S.U. 1997. Lysosomal Storage Diseases of Animals: An Essay in Comparative Pathology. *Veterinary Pathology*. 34: 527-548.
- KAUFFER, C.; HEINKEN, R. 1984. Informe sobre mortandad de equinos en el Dpto. Gastre por intoxicación con *Astragalus spp.* Dirección de Ganadería de la provincia de Chubut. Secretaría de Asuntos Agrarios. Argentina.
- MARTINEZ, A.; ROBLES, C. 2016. Primer caso de intoxicación natural por *Astragalus pehuenches* en bovinos en Argentina. x RAPA-PAVE. Esperanza, Argentina.
- MICHELOUD, J.F.; MARIN, R.; MARTINEZ, A.; MARTINEZ, O.G.; GARDNER, D.R.; GIMENO, E.J. 2017. Poisoning by *Astragalus garbancillo var. garbancillo* in sheep in Northwestern Argentina. *International Journal of Poisonous Plant Research*. 4:72-78
- MOLYNEUX, R.J.; GÓMEZ-SOSA, E. 1991. Presencia del alcaloide indolizidinico Swainsonine en *Astragalus pehuenches* (Leguminosae galegeae). *Boletín Sociedad Argentina Botánica*. 27: 59-64.
- MOLYNEUX, R.J.; MCKENZIE, R.A.; O'SULLIVAN, B.M.; EL-BEIN, A.D. 1995. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in weir vine (*Ipomoea sp. Q6 aff. Calobra*) and correlation with toxicity. *Journal of Natural Product*. 6: 878-886.
- MOREMEN, K.W. 2002. Golgi  $\alpha$ -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1573: 225-235.
- RALPHS, M.H.; GRAHAM, J.D.; JAMES, L.F. 2002. A close look at locoweed poisoning on shortgrass prairies. *Rangelands*. 24: 30-34.
- ROBLES, C.A.; SABER, C.; JEFREY, M. 2000. Intoxicación por *Astragalus pehuenches* (locoismo) en ovinos Merino de la Patagonia Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*. 81: 380-384.
- SCHERSON, R.A.; VIDAL, R.; SANDERSON, M.J. 2008. Phylogeny, biogeography, and rates of diversification of new world *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. *American Journal of Botany*. 95: 1030-1039.
- STEGELMEIER, B.L.; JAMES, L.F.; PANTER, K.E.; GARDNER, D.R.; PFISTER, J.A.; RALPHS, M.H.; MOLYNEUX, R.J. 1999. Dose response of sheep poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 448-456.
- YU, G.; ZHAO, Q.; WANG, J.; WANG, J.; WANG, Y.; SONG, Y.; GENG, G.; LI, Q. 2010. Swainsonine-producing fungal endophytes from major locoweed species in China. *Toxicon*. 56: 330-338.