

Efectos hemorreológicos y hepáticos del “muérdago criollo”, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. –Loranthaceae–

Mariana Ferrero¹, Alicia Dominighini¹, Guillermo Mengarelli¹, María de Luján Álvarez², María Teresa Ronco², Marcelo L. Wagner³, Alberto Gurni³, Cristina Carnovale^{2*} y Alejandra Luquita¹

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, República Argentina.

² Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) – CONICET. Suipacha 570 (2000) Rosario, República Argentina. Fax: 54 341 4399473. Correo electrónico: ifisel@citynet.net.ar; carnovale@ciudad.com.ar.

³ Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

Resumen

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. –Loranthaceae– (“muérdago criollo”) se utiliza habitualmente en la medicina popular “para producir un aumento en la fluidez de la sangre y una disminución en el nivel de colesterol plasmático”. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del tratamiento con *L. cuneifolia* en la fluidez sanguínea y la secreción biliar de colesterol *in vivo*. Los animales empleados fueron ratas Wistar macho adultas, divididos en cinco grupos (n = 5 cada uno). El grupo control recibió agua destilada por vía intraperitoneal. Los grupos de animales tratados recibieron, por la misma vía, extracto acuoso de *L. cuneifolia*, con las dosis de 1,5; 2,5; 3,5 y 5,5 mg/100 g de peso corporal; fueron inyectados diariamente, durante tres días consecutivos. Se midió la viscosidad sanguínea relativa y se determinó el índice de rigidez en una suspensión diluida de glóbulos rojos.

En los animales tratados con *L. cuneifolia* se originó un aumento significativo en la viscosidad sanguínea relativa e índice de rigidez con las dosis de 2,5; 3,5 y 5,5 mg/100 g de peso corporal. Además, se observó una disminución en el nivel plasmático de colesterol, que mostró una relación inversa con el aumento del índice de rigidez (rs: -0,65; p<0,05). Se detectó aumento en el flujo biliar y en la excreción de los ácidos biliares y el colesterol libre en las ratas tratadas (2,5; 3,5 y 5,5 mg/100 g de peso corporal).

El tratamiento con *L. cuneifolia* produjo una disminución del colesterol plasmático que aumentó el índice de rigidez y la viscosidad sanguínea debido a que el contenido sanguíneo de colesterol modifica la composición de la membrana del glóbulo rojo, que se refleja en cambios en el índice de rigidez. El aumento observado en la excreción biliar de ácidos biliares y colesterol libre condujo a una disminución del nivel de colesterol plasmático. El examen histológico del hígado reveló la ausencia de efecto hepatotóxico en relación con las dosis estudiadas.

Hemorheologic and hepatic effects of Argentine mistletoe, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. –Loranthaceae–

Summary

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. –Loranthaceae– (argentine mistletoe) is usually used in local folk medicine “to produce an increase of blood fluidity and a decrease of plasma cholesterol level”. The present work was carried out to evaluate the effect of *L. cuneifolia* treatment on the blood fluidity and on the biliary secretion of cholesterol. Adult male Wistar rats were divided in five groups (n = 5 each one): control animals

Palabras clave: *Ligaria cuneifolia* - viscosidad sanguínea total - colesterol plasmático - deformabilidad eritrocitaria - secreción biliar.
Key words: *Ligaria cuneifolia* - whole blood viscosity - plasmatic cholesterol - erithrocyte deformability - biliary secretion.

(C) were injected intraperitoneally with water and treated rats received 1.5, 2.5, 3.5 and 5.5 mg/100 g body weight of aqueous extract of *L. cuneifolia* each 24 h during 3 days. The relativity viscosity of blood $[(h_r)^{45/Hct}]$ was measured and the rigidity index (RI) in the diluted red cell suspensions was determined. *L. cuneifolia* treatment produces, a significant increase in relativity viscosity and in rigidity index at doses 2.5, 3.5 and 5.5 mg/100 g body weight. Also, a decrease of plasma Cho level was observed, which showed a negative association with RI increase (rs: -0.65; $p < 0.05$). Increases in bile flow and biliary outputs of bile acids and cholesterol were observed in treated rats (2.5, 3.5 and 5.5 mg/100 g body weight). The *L. cuneifolia* treatment produces a decrease of plasma cholesterol level increasing the RI and the blood viscosity, because the blood cholesterol content changes the red blood cell membrane composition inducing modification of red blood cell membrane rigidity index. The increase observed of the bile acid and cholesterol biliary output causes a decrease of plasma cholesterol level. Histological examination of livers demonstrated that did not effect hepatotoxic with the different doses.

Introducción

Las preparaciones de hojas y tallos de diferentes plantas pertenecientes a la familia Loranthaceae se han utilizado ampliamente en la medicina tradicional. Las plantas de esta familia han sido reconocidas por diversas comunidades como hierbas terapéuticas.

Actualmente la familia Loranthaceae se divide en tres familias: Loranthaceae (*sensu strictu*), Viscaceae y Eremolepidaceae, pero algunos autores aún hacen referencia a la división tradicional, considerando a todos los muérdagos como Loranthaceae (*sensu latu*) (Barlow, 1964; Kuijt, 1988). *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) crece en el Noroeste y en la región central de la Argentina. Las infusiones de las hojas y los tallos de *L. cuneifolia* han sido utilizadas como sustituto de las infusiones de *Viscum album* L. (Viscaceae), por su supuesta capacidad para disminuir la presión sanguínea. Además, estas dos especies hemiparásitas son empleadas corrientemente en medicina popular "para producir aumento de la fluidez sanguínea y disminución del nivel de colesterol plasmático".

Los estudios sobre la anatomía, los polifenoles y las propiedades inmunoquímica de *L. cuneifolia* fueron realizados por Varela y Gurni en 1995, y Wagner y col. en 1998. Originalmente, las infusiones del muérdago criollo se utilizaron para disminuir la presión sanguínea (Domínguez, 1928; Ratera y col. 1980; Taira y col., 1994).

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del tratamiento con *L. cuneifolia* sobre la fluidez de la sangre por medio de parámetros hemorreológicos en ratas Wistar. Los estudios previos (Fawcett y

Menkes, 1994; Chabanel y col. 1983) permitieron determinar que las modificaciones en la concentración plasmática de colesterol alteran la capacidad de deformarse de los eritrocitos y de la viscosidad plasmática; en consecuencia, conducen a la disminución de la fluidez sanguínea.

Dado que la vía principal de eliminación de colesterol del organismo se realiza a través del hígado mediante la transformación de colesterol en ácidos biliares (AB) y la excreción a bilis posterior, tanto de los AB como de colesterol (Russel, 1992), se consideró de importancia estudiar el efecto de *L. cuneifolia* sobre la fisiología hepática.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se recogieron especímenes del hemiparásito que crecían sobre diferentes hospedantes; la identificación fue realizada por un integrante del grupo de investigación (Gurni, A.A.). Los ejemplares fueron remitidos al Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez", de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (BAF 9018) y su clasificación se realizó de acuerdo con el trabajo realizado por Abbiatti (1946).

Extractos

El material vegetal fue secado al aire, se separaron las hojas de los tallos y se molieron con un molinillo de cuchillas rotativas. Se pesaron 5 g de hojas molidas

con las que se preparó una infusión con agua hirviendo durante 30 min. Los extractos fueron evaporados bajo presión reducida hasta llegar a sequedad. Posteriormente se prepararon las diluciones con agua destilada.

Animales y tratamiento

Se emplearon ratas Wistar macho adultas con pesos que oscilaban entre 400 y 450 g; fueron alojadas de a dos por jaula donde se mantuvieron con períodos de 12 horas luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar normal y con libre acceso al agua. Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la *Guía para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (National Institutes of Health, Publicación nro. 86-23, modificada en 1985)*.

Se formaron 5 grupos experimentales de 5 ratas cada uno. Se determinó el hematocrito y el colesterol plasmático (valores basales) en la sangre que se les extrajo de la cola. Posteriormente se les administró el extracto de *L. cuneifolia*, por vía intraperitoneal, con una inyección diaria durante tres días consecutivos. Las ratas tratadas recibieron un volumen de 0,2 ml de las dosis crecientes (mg/100 g de peso corporal): 1,5; 2,5; 3,5 y 5,5. Al grupo control se le inyectó solo el vehículo (agua).

Procedimientos experimentales

El día del experimento las ratas fueron pesadas y luego, anestesiadas con pentobarbital (50 mg/100 g de peso corporal, i.p.). Se colocó un catéter de poliestireno PE10 (Intramedic, EE.UU.) en el conducto biliar y se recolectó la bilis en tubos previamente pesados, colocados en hielo, por períodos de 15 min, durante 60 min. Se mantuvo la temperatura corporal (rectal) a $38,0 \pm 0,5$ °C a lo largo del experimento para evitar alteraciones del flujo biliar por hipotermia (Roberts y col., 1967). Finalizada la recolección de bilis, se realizó la extracción de sangre por medio de punción cardíaca; inmediatamente después, el hígado fue extraído y pesado.

La viscosidad sanguínea (η_s) y la plasmática (η_p) se midieron con viscosímetro Wells-Brookfield LVT cono-plato a una velocidad de cizallamiento de 230 s^{-1} , a 37 °C. La viscosidad sanguínea relativa estandarizada a un hematocrito (Hto) del 45%, se calculó utilizando la ecuación de Matrai y col. (Chailley y col., 1981):

$$\eta_r = (\eta_s/\eta_p)^{45/\text{Hto}} = (\eta_r)^{45/\text{Hto}}$$

La viscosidad sanguínea es una medida de la fluidez de la sangre; existe entre ambas una relación inversa.

Las mediciones de filtración eritrocitaria se realizaron con la técnica de Reid y col., según la versión modificada en 1976. La sangre entera se centrifugó a 1.900 G durante 5 min a 25 °C, y se separó el plasma y la capa de glóbulos blancos. Los glóbulos rojos (GR) se lavaron dos veces con buffer-fosfato salino (PBS) pH 7,4; 285 mOsm/L, con un contenido de albúmina bovina de 0,25%. Luego del lavado se colocó 1 ml de suspensión de GR al 10% en una pipeta graduada; mediante una presión de filtración negativa de 10 cm H₂O, se hizo pasar la suspensión a través de un filtro de polycarbonato de 13 mm (Nucleopore Corr. USA) con poros de 5 µm. Los resultados se expresaron como índice de rigidez (IR):

$$\text{IR} = (T_s - T_b) / (T_b) \times 100/\text{Hto}$$

donde, T_s corresponde al pasaje de la suspensión de células. T_b es el pasaje del medio PBS. Hto es el hematocrito de la suspensión de GR al 10%. IR es una estimación de la deformabilidad eritrocitaria.

Se utilizaron muestras de sangre heparinizada para determinar la concentración plasmática de colesterol (pre y post- inyección de *L. cuneifolia*) mediante el método enzimático de esterasa-oxidasa (Henry y col., 1974).

Se tomaron muestras de suero para determinar las actividades de fosfatasa alcalina (FA), lactato dehidrogenasa (LDH), transaminasa glutámico-pirúvica [GPT (ALAT)], transaminasa glutámico-oxalacética [GOT (ASAT)] y colinesterasa. Las actividades enzimáticas en el suero fueron medidas con equipos de cinética estándar (Wiener Lab., Rosario, Argentina).

El flujo biliar (FB) se estimó por gravimetría, considerando una densidad de bilis de 1,0 g/ml y se expresó como µl/min x g de hígado. La concentración de ácidos biliares (AB) en bilis se determinó utilizando 3α-hidrosteroides-dehidrogenasa según el método de Talalay modificado por Berthelot (Talalay, 1960; Berthelot y col. 1970). La concentración de proteínas (Pr) en muestras de bilis se midió por el método de Lowry (Lowry y col. 1951), utilizando albúmina bovina como estándar.

La concentración de colesterol biliar se determinó por medio del método enzimático de esterasa-oxidasa (Fawcett y Menkes, 1994). La excreción de constituyentes biliares se determinó por medio del cálculo del producto del FB por la concentración biliar.

Histología

Se colocaron fragmentos de hígado en formaldehído 10%; 24 horas más tarde fueron embebidos en parafina, cortados y teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson-Alcian-blue.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio $\pm$ EEM. El análisis estadístico fue realizado mediante la aplicación del análisis de la varianza de dos vías y como test de referencia, el de Newman-Keul. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa de computación PHAR/PCS, Micro-Computer Specialist, Filadelfia.

Resultados

Muestras de sangre

Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas de FA, LDH, GPT (ALAT), GOT (ASAT), y colinesterasa no varían con las diferentes dosis de extracto acuoso de *L. cuneifolia* (Valores de las actividades enzimáticas del grupo control en UI/l: FA: $260,0 \pm 10,5$, LDH: 1684 ± 285 , GPT(ALAT): $33,0 \pm 5,9$, GOT(ASAT): $50, 5 \pm 7,3$, colinesterasa: 714 ± 285 expresado como el promedio no menor de 5 animales $\pm$ EEM).

Parámetros hemorreológicos

La η_p no varió con las diferentes dosis de extracto de *L. cuneifolia*.

La figura 1 muestra los efectos de la administración intraperitoneal de las diferentes dosis de *L. cuneifolia* sobre los parámetros hemorreológicos. En el gráfico A se observan los valores de la viscosidad sanguínea relativa $[(\eta_r)^{45/Hto}]$. Los resultados revelan que la $(\eta_r)^{45/Hto}$ aumenta con las distintas dosis de *L. cuneifolia*; alcanza un valor máximo con la dosis de 2,5 mg/100 g de peso corporal (PC). Como se observa en el gráfico B, las tres dosis de *L. cuneifolia* (2,5; 3,5; 5,5 mg/100 g PC) incrementan significativamente el IR.

La tabla 1 muestra los cambios en el nivel de colesterol plasmático antes y después de la inyección de las diferentes dosis de *L. cuneifolia*.

Determinación de flujo biliar y excreción de componentes biliares

En la figura 2 (pág. 10), se presentan los datos sobre el flujo de bilis y la excreción biliar de diferentes componentes. El flujo biliar y la excreción de ácidos biliares (gráficos A y B) aumentan significativamente a partir de la dosis de 2,5 mg/100 g PC. La excreción biliar de colesterol (gráfico C) muestra un aumento significativo en los animales tratados con dosis de 2,5 y 3,5 mg/100 g PC. Con las dosis de 1,5 y 5,5 mg/100 g PC, el aumento observado no fue estadísticamente significativo.

Histología

El examen histológico hepático reveló que los acinos permanecieron inalterados después del tratamiento en todos los casos. En las ratas tratadas con 2,5; 3,5 y 5,5 mg/100 g PC se observó que algunos hepatocitos presentaron un aumento en el tamaño de los núcleos; esta modificación no es significativa.

Discusión

Los resultados de este estudio indican que el tratamiento con *L. cuneifolia* no produce daño hepático con las dosis utilizadas; hecho verificado por la ausencia de variaciones en las actividades de las enzimas séricas después de la administración de las diferentes dosis de *L. cuneifolia*. Además, la carencia de acción hepatotóxica también se comprueba por el examen histológico.

El cálculo de la $(\eta_r)^{45/Hto}$ determina la viscosidad sanguínea sin la influencia del hematocrito e independiente de la viscosidad plasmática (η_p). El valor de la $(\eta_r)^{45/Hto}$ presenta un aumento significativo en las ratas tratadas con las dosis de 2,5; 3,5 y 5,5 mg/100 g PC debido a una pérdida de la deformabilidad eritrocitaria, estimada mediante la determinación del índice de rigidez IR. El tratamiento con 1,5 mg/100 g PC de *L. cuneifolia* muestra una disminución significativa del colesterol plasmático sin producir alteración de la $(\eta_r)^{45/Hto}$ (Tabla 1 y Figura 1B).

Los niveles de colesterol en las muestras de plasma mostraron una asociación con una rigidez eritrocitaria aumentada, señalando una relación inversa entre los niveles de colesterol y la rigidez eritrocitaria ($r_s: -0,65$, $p < 0,05$).

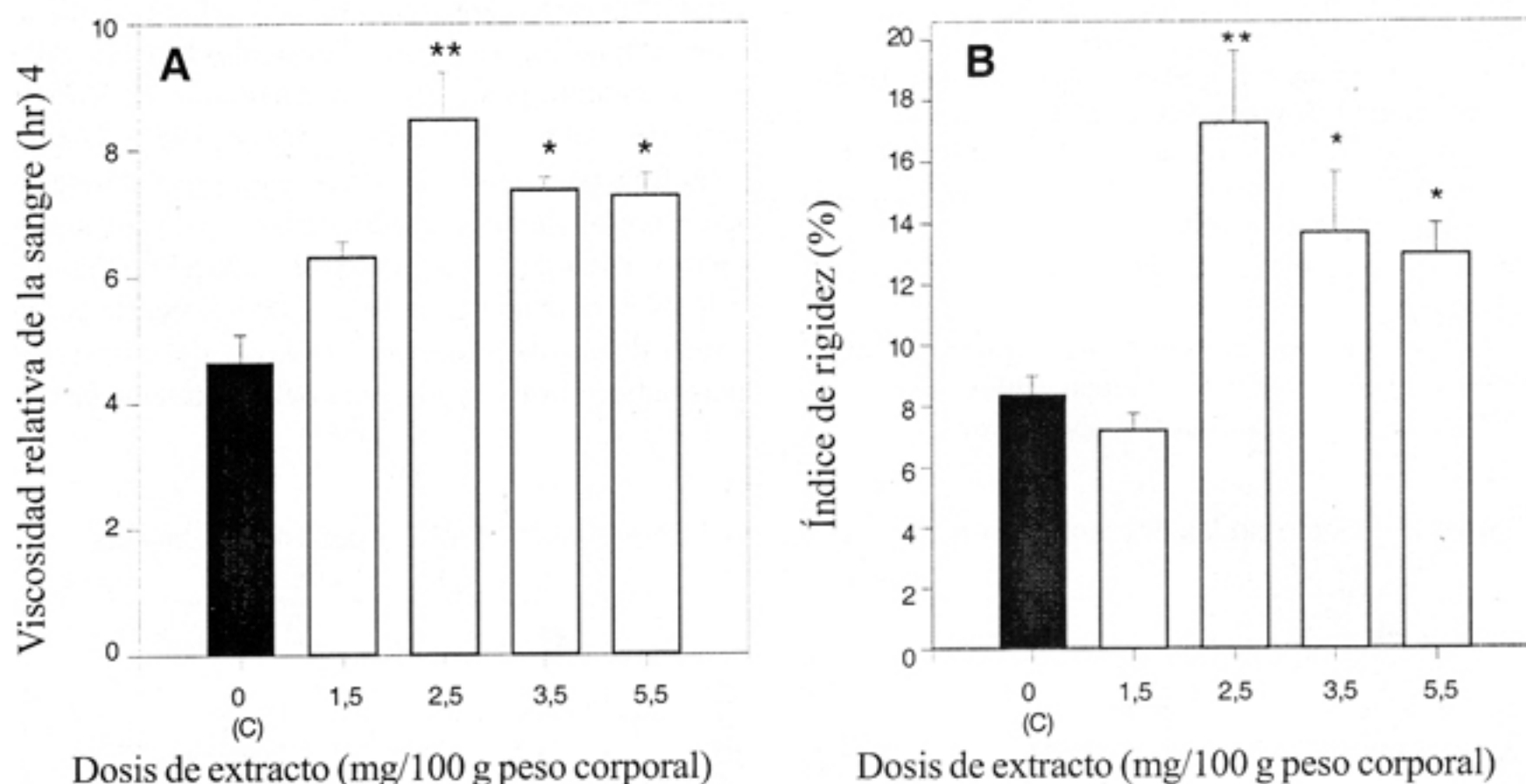
Figura 1.- Efecto de las diferentes dosis de *L. cuneifolia* sobre los parámetros hemorreológicos

Gráfico A: La viscosidad sanguínea relativa estandarizada a un hematocrito (Htc) del 45% se calculó para una velocidad de corte de 230 s^{-1} utilizando la ecuación de Matrai y col. (1987).

Gráfico B: índice de rigidez determinado por filtración de una suspensión diluida de glóbulos rojos (Hematocrito 10%) a través de una membrana de microporos.

C: grupo control.

Los datos se muestran como el promedio de cinco ratas $\pm$ EEM.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control.

Estos resultados concuerdan con la hipótesis propuesta por Fawcett y Menkes (1994) quienes sostuvieron que el menor nivel de colesterol plasmático total se relaciona con una disminución en la proporción de eritrocitos deformables y, en consecuencia, contribuye a aumentar el IR.

La disminución de colesterol plasmático se acompaña con una pérdida de colesterol en la superficie del glóbulo rojo y de un cambio esferoidal en su forma (Chabanel y col., 1983), ambas modificaciones conducen a una menor deformabilidad eritrocitaria y a un aumento del IR.

Tabla 1.- Disminución del nivel de colesterol plasmático luego de la inyección de diferentes dosis de *L. cuneifolia*

Dosis de <i>Ligaria cuneifolia</i> (mg / 100 g peso corporal)				
0 (C)	1,5	2,5	3,5	5,5
$0,0 \pm 0,9$	$-19,7 \pm 1,9^*$	$-17,3 \pm 1,0^*$	$-15,0 \pm 2,0^*$	$-18,6 \pm 1,1^*$

El colesterol basal fue de $62,82 \pm 1,18 \text{ mg/ml}$ expresado como el promedio de al menos cinco animales del grupo Control $\pm$ EEM, no presentando el colesterol basal diferencia significativa entre los distintos grupos experimentales.

La disminución del nivel de colesterol plasmático se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta \text{Col (mg/ml)} = \text{Col}_{\text{basal}} - \text{Col}_{\text{post-Lc}}$$

$\text{Col}_{\text{basal}}$: Concentración plasmática de Col determinada en sangre antes de la inyección del extracto.

$\text{Col}_{\text{post-Lc}}$: Concentración plasmática de Col determinada en sangre luego de la inyección del extracto de *L. cuneifolia*.

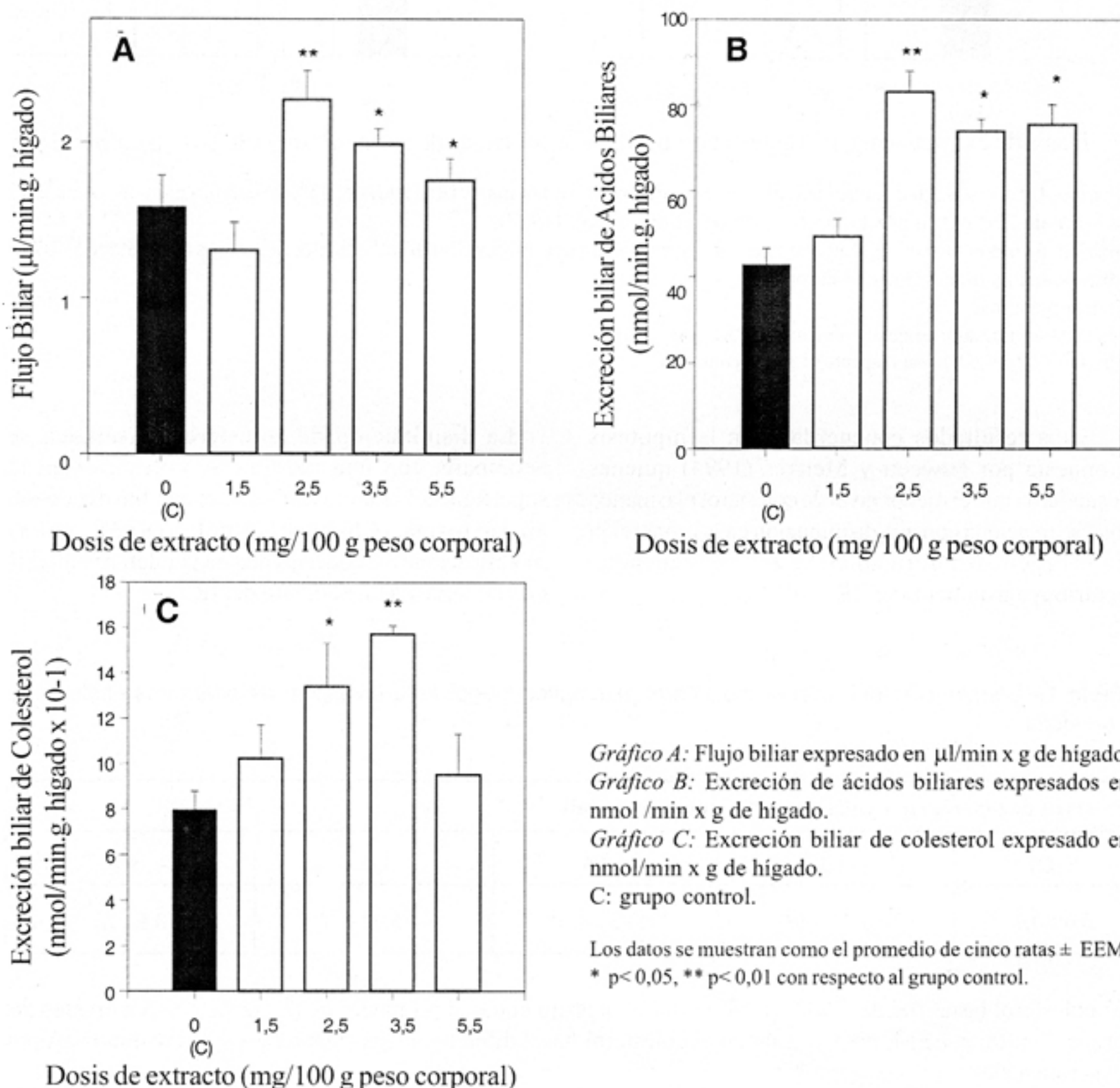
C: grupo control, inyectado solo con el vehículo (agua).

Los valores se expresan como el promedio de al menos cinco animales por grupo $\pm$ EEM.

* $p < 0,05$ con respecto al grupo control.

La vía principal de eliminación de colesterol del organismo se realiza a través del hígado mediante la transformación de colesterol en ácidos biliares (AB) y la excreción posterior en la bilis tanto de los AB como de colesterol (Carey y Duane, 1967; Russel, 1992). En consecuencia, la elevación significativa de la excreción biliar de ácidos biliares y de colesterol para las dosis de 2,5; 3,5 y 5,5 mg / 100 g PC (Figuras 2 B y C), obtenida en nuestro estudio, podría ser la causa de la disminución del nivel de colesterol plasmático observada después del tratamiento con *L. cuneifolia*.

Figura 2.- Efecto de las diferentes dosis de *L. cuneifolia* sobre el flujo de bilis y parámetros biliares



Dado que los AB constituyen el estímulo primario para la formación del flujo biliar (Turley y Dietschy, 1982; Björkhem, 1985), se asume que el aumento observado en el flujo de bilis (Figura 2 A) es el resultado de una excreción biliar aumentada de AB.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el tratamiento con *L. cuneifolia* produce, debido a la presencia de los distintos constituyentes de su extracto (Fernández y col. 1998), una disminución del colesterol plasmático que lleva al aumento del IR y de la viscosidad sanguínea, estos fenómenos, aumento del IR y de la viscosidad, se debe a que el contenido sanguíneo de colesterol modifica la composición de la membrana del glóbulo rojo, que se refleja en cambios en el índice de rigidez. El aumento observado en la excreción biliar de ácidos biliares y colesterol libre conduce a una disminución del nivel de colesterol plasmático. Por otra parte, el examen histológico del hígado reveló la ausencia de efecto hepatotóxico a las dosis estudiadas.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación se llevó a cabo con subsidios otorgados por la Universidad Nacional de Rosario y por la Universidad de Buenos Aires.

Los autores agradecen al Dr. Tomás Telles por su participación en el análisis histológico; a Cecilia Larroca y a Juan Monti por su asistencia técnica.

Referencias bibliográficas

- Abbiatti, D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Revista del Museo de La Plata* (nueva serie) 7 (sección botánica): 1-110.
- Barlow, B.A. (1964). "Classification of Loranthaceae and Viscaceae". *Proceedings of Linnean Society of New South Wales* 89: 268-272.
- Berthelot, P.; Erlinger, S.; Dhumeaux, D. y Preaux, A.M. (1970). "Mechanism of phenobarbital induced hypercholesterolemia in the rat". *Am. J. Physiol* 819: 809-813.
- Björkhem, I. (1985). *Sterols and Bile Acids. Mechanism of bile acid synthesis in mammalian liver*, Amsterdam, In: Danielsson H, Sjövall J, eds. Elsevier Scientific Publishers: 231-236.
- Carey, M. y Duane, W.C. (1967). "Enterohepatic circulation". In: Arias, I.; Boyer, J.L.; Jakoby, W.B.; Schachter, D. y Shafritz, D.A. eds., *The Liver: Biology and Pathology*, New York, Raven Press: 719-725.
- Chabanel, A.; Flamm, M. y Sung, K.L.P. (1983). "Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity". *Biophys. J* 44: 171-176.
- Chailley, B.; Giraud, F. y Claret, M. (1981). "Alteration in human erythrocyte shape and the state of spectrin and phospholipid phosphorylation induced by cholesterol depletion". *Biochem. Biophys Acta* 643: 636-641.
- Domínguez, J.A. (1928). *Contribuciones a la materia médica*, Buenos Aires, Peuser: 260-264.
- Fawcett, J.P. y Menkes, D.B. (1994). "Does cholesterol depletion have adverse effects on blood rheology?". *Angiology* 45(3): 199-206.
- Fernández, T.; Wagner, M.L.; Varela, B.G.; Ricco, R.A.; Hajos, S.E.; Gurni, A.A. y Álvarez, E. (1998). "Study of an Argentine Mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae)". *Journal of Ethnopharmacology* 62: 25-34.
- Henry, R.J.; Cannon, D.S. y Winkelman, J.W. (1974). *Clinical Chemistry Principles and Techniques*. Harper y Row: 1440-1449.
- Kujit, J. (1988). "Monograph of the Eremolepidaceae". *Systematic Botany Monographs* 18: 1-60.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Ratera, E.L. y Ratera, M.O. (1980). *Plantas de la Flora Argentina empleadas en Medicina Popular*, Buenos Aires, Hemisferio Sur: 823-835.
- Reid, H.L.; Barnes, A.J.; Lock, P.J.; Dormandy, J.A. y Dormand, T.L. (1976). "A simple method for measuring erythrocyte deformability". *J. Clin. Pathol.* 29: 855-858.
- Roberts, R.J.; Klaassen, C.D. y Plaa, G.L. (1967). "Maximum biliary excretion of bilirubin and sulfobromophthalein during anaesthesia-induced alteration of rectal temperature". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 125: 313-316.
- Russel, D.W. (1992). "Cholesterol biosynthesis and metabolism". *Cardiovasc. Drugs Ther* 6: 103-110.
- Taira, C.A.; Wagner, M.L.; Adrados, H.M.; Piño, R. y Gurni, A.A. (1994). "Estudio Farmacológico de un Agente Vasoactivo presente en *Ligaria cuneifolia* var. *cuneifolia*". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 13(2): 91-95.
- Talalay, P. (1960). "Enzymatic analysis of steroid hormones". *Meth. Biochem. Anal.* 8: 119-143.
- Turley, S.D. y Dietschy, J.M. (1982). *The Liver. Biology and Pathobiology*, New York. Arias, I.; Popper, H. y Schachter, D. eds., Raven Press: 467-474.
- Varela, B.G. y Gurni, A.A. (1995). "Anatomía foliar y caulinar comparativa del muérdago criollo y del muérdago europeo". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 14(1): 21-29.
- Wagner, M.L.; Fernández, T.; Varela, B.; Álvarez, E.; Ricco, R.; Hajos, S. y Gurni, A. (1998). "Anatomical, Phytochemical and Immunochemical Studies on *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae)". *Pharmaceutical Biology* 36(2): 1-9.