

TÉCNICAS DE COMPROBACIÓN DE ACTIVIDAD TERAPÉUTICA

A la luz de los modernos avances en botánica, fitoquímica, farmacología, farmacocinética, farmacodinamia y toxicología, el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas deberá ser constatado y validado para garantizar una terapia adecuada, eficaz y con la menor incidencia de ocasionar riesgos para el paciente.

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible. Entre los métodos extractivos más empleados para investigación contamos con:

1. **Extracción para tamizaje:** Se realiza por medio de una maceración a temperatura ambiente con 1 a 3 disolventes de diferentes polaridades. Por lo general se emplean: diclorometano o hexano, éter o etanol, y agua.
2. **Aislamiento y elucidación estructural:** Para aislar e identificar moléculas con actividad terapéutica se recurre a técnicas de filtración, extracción selectiva, partición, intercambio iónico, absorción, filtración en gel, cromatografía y cristalización.

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Con ella se puede conocer la capacidad que tiene una droga vegetal para comprobar una eventual actividad antimicrobiana. Se emplean métodos de difusión en placas o discos con agar o en tubos con caldo para cultivo. El método consiste en impregnar discos de papel secante de 6 mm de diámetro y 0,6 mm de grosor con 50 µl del extracto vegetal. Se aplican los discos en el cultivo y se incuba a 35°C durante 24 horas. Al retirar debemos ver (en caso de actividad) halos de inhibición que se miden en mm. Si el halo dio mayor a 9 mm. el resultado es positivo. Si el halo dio entre 6-9 mm. la actividad se considera intermedia o moderada. Si el halo fue inferior a 6 mm. se considera negativo (sin actividad).

Con este método se puede determinar la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) que requiere la droga vegetal para matar al microorganismo. La CIM es la concentración más baja que requiere el extracto ensayado para que haya crecimiento visible. Los microorganismos más frecuentemente utilizados son:

Bacterias: *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *S. typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae*.

Levaduras y Hongos: *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium spp.*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyllum mentagrophytes*.

TALLER DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

Protozoarios y Parásitos: *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium spp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi*.

Virus: *Herpes simplex virus tipo I y II*, *virus de la estomatitis vesicular*, *Coxsackie virus*, *poliovirus*, *citomegalovirus*, etc.

En algunos casos hay que relacionar los resultados con el estudio etnobotánico. Por ejemplo, durante un screening de actividad antiherpética, el extracto acuoso de la especie *Gamochaeta simplicicaulis* presentó sólo un 14% de inhibición de crecimiento frente al virus HSV-1 (herpes simplex virus tipo 1) en cultivos de células VERO. Este resultado parcial hubiera desalentado estudios posteriores. Sin embargo los estudios etnobotánicos daban cuenta de un amplio empleo de esa planta como antiviral.

Cambiando el método, se observó que si el extracto era administrado al mismo tiempo que el inóculo del virus en las células de cultivo, la inhibición era del 99%. De ahí se infiere que el extracto actúa por inhibición en la adsorción del virus a la célula y no tanto por ser tóxico viral directo. En estudios posteriores se aisló un polisacárido aniónico con actividad antiherpética.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL

La aplicación de nuevas drogas en el campo de la terapéutica resulta ser un proceso largo, costoso y no exento de dificultades, pudiendo llegar a los 10-20 años de desarrollo y costos que pueden alcanzar 100-500 millones de dólares. En el caso del *paclitaxel* (agente antitumoral de origen vegetal presente en el género *Taxus* sp.), trascurrieron 29 años desde que se descubrió su actividad citotóxica a través del programa de "screening" del National Cancer Institute (NCI) de los Estados Unidos.

Este programa comenzó en 1955 y hasta la fecha ha evaluado más de 120.000 extractos diferentes correspondientes a unas 35.000 especies vegetales. Por medio del Developmental Therapeutics Program (Programa de Desarrollo Terapéutico) recibe muestras provenientes de diferentes universidades, centros de investigación, agencias gubernamentales y compañías farmacéuticas.

Se ensayan tanto fracciones como compuestos puros y extractos totales de una planta, en principio sobre 3 líneas celulares *in vitro*. Si pasa esa prueba se continúa con una batería de 60 líneas celulares adicionales para confirmar la actividad. Estos ensayos son sin costo para quien lo envía y se suscribe un contrato de confiabilidad entre las partes. Los ensayos *in vivo* sobre animales quedan limitados a aquellos casos donde sea necesario e imprescindible ese ensayo, ya que existen restricciones impuestas por las sociedades protectoras de animales.

La investigación pre-clínica puede ser llevada a cabo en cultivos de tejidos tumorales, tumores trasplantados (Ehrlich) o tumores inducidos por sustancias carcinogénicas (por ejemplo nitrosaminas, dimetilbenzantraceno = DMBA, acetato de 12-decanoilforbol, etc). Entre las líneas celulares de mayor estudio cuentan:

- Carcinoma de células escamosas (A-431).
- Carcinomas humanos de mama (U-373)
- Carcinosarcoma de ratas (Walker 256)
- Carcinoma de pulmón de ratón (Lewis)
- Carcinoma humano de colon (COL_2).
- Leucemia linfocítica de ratón (P-388).
- Melanoma humano (MEL-2).

TALLER DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

En 1991 el prof. Mc Laughlin y colaboradores da comienzo a una nueva etapa en la investigación fitoquímica con la introducción de algunos bioensayos primarios como el test del disco de papa o el de la *Artemia salina*, comenzando así la época caracterizada por los "screenings" y el "fraccionamiento guiado por bioensayo". Este fraccionamiento consiste en la aplicación de técnicas de separación y aislamiento sobre un determinado extracto, con el objeto de hacer un seguimiento de la actividad biológica de las fracciones y compuestos puros obtenidos, para finalizar en la identificación de o los principios activos responsables de la actividad demostrada por el extracto original.

Una secuencia estándar ha seguir en screenings antitumorales consiste en seleccionar primero sustancias que actúen por un determinado mecanismo, o mecanismo conocido. Luego se aplican ensayos celulares a efectos de observar si se afecta la división celular. Finalmente por medio de los ensayos *in vivo* se descartan aquellas sustancias que son inactivadas en el metabolismo animal.

El **ensayo del disco de papa** es un test sencillo que permite determinar también actividad antitumoral. Los tumores de tipo "agalla de corona" constituyen una enfermedad tumoral en muchos vegetales, estando inducidos por una bacteria Gram (-), el *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria contiene Ti-plásmidos (inductores de tumor) con carga genética (ADN) suficiente para transformar células normales en células tumorales.

El fundamento de emplear este ensayo radica en que algunos mecanismo tumorogénicos son comunes tanto a plantas como animales, lo cual implica que aquella droga que sirva para desactivar este mecanismo en una planta, lo puede hacer también en un ser vivo. La única limitación es que la muestra o extracto a evaluar no tenga actividad antibacteriana propia frente a Gram (-) ya que puede generar falsos positivos.

La técnica consiste en emplear papas peladas (si son rojizas mejor) previamente esterilizadas en hipoclorito de sodio durante 20 minutos. Se cortan unas rodajas o discos (1-1,5 cm de diámetro) con un sacabocados y se colocan en una placa de Perti con agar (no más de 5 discos por placa). Luego se inocula con 2 ml de caldo de cultivo de *A. tumefaciens* junto con 8 mg del extracto a ensayar.

Otras muestras se inoculan solo con el caldo de bacteria, ya que serán las "muestras control". Se incuban las muestras a temperatura ambiente (27°C) y se sellan las placas 12-15 días. Finalizado ese lapso de tiempo, se abren las placas y se observarán los porcentajes de inhibición en la formación de tumores respecto a las muestras control. Se considera como promisorio aquel extracto o compuesto que generó más del 20% de inhibición.

ACTIVIDAD DIURÉTICA

En estos ensayos se compara el volumen de orina excretado por una rata tratada durante un período de tiempo con una droga de elección. Generalmente se compara con Hidroclorotiazida y se administra a grupos de ratas en ayunas. Los mecanismos de acción de las drogas vegetales diuréticas se llevan a cabo mediante mecanismos acuareáticos, siendo muy escasos los ejemplos de vegetales que actúen por mecanismos de interferencia de reabsorción tubular de sodio.

ACTIVIDAD ESPASMOLÍTICA

Se estudia a través de las contracciones inducidas por una sustancia espasmogénica en un órgano aislado (generalmente íleon de cobayo, duodeno de rata, yeyuno de conejo, útero, tráquea, músculo

TALLER DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

esquelético de ratas, etc). La inducción por lo general se realiza con acetilcolina. También se utiliza la prueba de la inhibición de diarrea inducida por aceite de ricino.

La droga vegetal puede ser administrada antes (efecto antiespasmódico) o después (efecto espasmolítico). El control se hace generalmente con papaverina (relajante del músculo liso). Ejemplos de principios activos antiespasmódicos tenemos: flavonoides (apigenina, quercetina, kaempferol), aceites esenciales (anís, tomillo, ajo, menta, alcaravea, manzanilla), alcaloides (papaverina, codeína, escopolamina, hioscina, atropina).

ACTIVIDAD ANTIULCEROSA GÁSTRICA

Para ello pueden utilizarse los tests antiespasmódicos anticolinérgicos (atropina, hioscina) los cuales reducen la acidez gástrica y los espasmos. Pero más confiable o específico es trabajar con agentes químicos ulcerogénicos sobre modelos animales (aspirina, indometacina, histamina, prednisolona, alcohol) o agentes psíquicos (estrés). Para producir úlceras por estrés se somete a ratas o cobayos a condiciones de semicongelamiento, ahogo o descargas eléctricas reiteradas.

Experimentalmente se sabe que las prostaglandinas (especialmente PGE₂) son inhibidores de las úlceras inducidas por alcohol, aún en pequeñas dosis, modificando la secreción ácida gástrica y estimulando la secreción de mucus en la mucosa. La aspirina y otros antiinflamatorios son inhibidores de la secreción de prostaglandinas protectoras gástricas.

Flavonoides como el *hipoletin-8-glucósido* (presente en el género *Sideritis*) presenta actividad antiinflamatoria y citoprotectora gástrica. De igual modo los glucósidos fenólicos de la *Filipendula ulmaria* cumplen con ambas actividades. Los curcuminoides de la *Curcuma longa* han demostrado selectividad enzimática al actuar sobre la vía COX-2 (es decir, protegiendo la mucosa gástrica, sin afectar la producción de prostaglandinas). Otras plantas que previenen las úlceras gástricas son el jugo de repollo y el regaliz, aunque sus mecanismos de acción no están del todo dilucidados.

ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA

Para evaluar la actividad de un extracto vegetal como protector hepático se administra en animales de manera previa, durante la intoxicación o después de la intoxicación. Las sustancias empleadas como hepatotóxicas suelen ser: *etanol*, *paracetamol* y *tetracloruro de carbono*. Las necropsias de los animales revelan el grado de daño tisular. En vida, se medirán las transaminasas y demás enzimas hepáticas en sangre, como así también algún parámetro afectado por la intoxicación hepática: por ejemplo inducción del sueño por hexobarbital.

También la prueba de hepatoprotección puede realizarse en cultivos de hepatocitos. Otro test mide el grado de regeneración hepática *in vivo* que producen algunos aceites esenciales, sobre animales parcialmente hepatectomizados. Durante un lapso de tiempo se les administra el extracto y al cabo de unos días se pesan los animales y se hace la autopsia que determinará el éxito del tratamiento.

Plantas como la *Schisandra sinensis* o *Picrorhiza kurroa* demostraron prevenir los daños hepáticos inducidos por paracetamol. El *Cyperus rotundus*, el *Silybum marianum* (cardo mariano) y la misma *Picrorhiza kurroa* demostraron evitar la toxicidad hepática inducida por *tetracloruro de carbono*.

Los modelos experimentales en los que se administran lipoproteínas específicas que generan hepatotoxicidad por incremento del complemento, son los ideales para reproducir *in vitro*, modelos de

TALLER DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

hepatitis viral. Resultan efectivos en estos modelos la silibina (cardo mariano), la cinarina (alcachofa), glicirricina y ácido glicirretínico (regaliz), picrósidos I y II (*Picrorhiza kurroa*), etc.

ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Se trabaja *in vitro* sobre músculo liso aislado a efectos de lograr vasodilatación o evitar vasoconstricción. Entre los mecanismos de acción para trabajar en los tests figuran:

1. Bloqueantes alfa-1-adrenérgicos: prazocina, fentolamina, fenoxibenzamina.
2. Estimulantes de la síntesis de óxido nítrico: incrementan la producción local de GMP-cíclico que causa hiperpolarización del músculo liso vascular (vasodilatación): nitritos como el mono, di, y trinitrato de isosorbide.
3. Bloqueadores de los canales de calcio: verapamilo, nifedipina o diltiazem.
4. Inhibidores de la conversión de angiotensina (ACE-1 y ACE-2): enalapril, losartán, captopril.
5. Beta-bloqueantes: atenolol, propranolol.
6. Drogas de acción central: metildopa, clonidina.

Entre los métodos *in vivo* se trabaja con ratas normotensas anestesiadas mediante inyección i.p. de pentobarbital. La presión se mide por medio de canulización carotídea. Las sustancias o extractos a experimentar se introducen por vena yugular o femoral. Otro test es el alimentar a ratas con comidas salinas y agua con 6% de cloruro de sodio. Al 10º día aparece hipertensión en los animales. *In vitro* puede trabajarse por medio de la dilatación de aorta de conejo precontractada con noradrenalina.

ACTIVIDAD ANTIAGREGANTE - ANTITROMBÓTICA

Estos estudios miden la capacidad de ciertos extractos o principios activos vegetales para evitar el fenómeno de coagulación. La trombosis (coagulación sanguínea) es un evento complejo que involucra varios factores:

- Plaquetas (trombocitos): pueden ser activadas por exposición frente a hormonas (adrenalina, vasopresina), autacoides (ADP=adenosin difosfato), serotonina, eicosanoides, PAF (factor de agregación plaquetaria), factores coagulantes (trombina, plasmina) y proteínas vasculares (colágeno, elastina).

Todos estos factores pueden interactuar con receptores situados en las propias plaquetas lo cual despierta o genera la activación de algunos procesos intracelulares que involucran segundos mensajeros (adenilciclasa), protein-C-kinasa y canales cálcicos, lo cual conlleva a la liberación de ácido araquidónico de la membrana fosfolípídica que determina la FORMACION DEL TROMBO Y LA AGREGACION PLAQUETARIA.

Los modelos de inhibición de la agregación plaquetaria no sólo sirven para determinar el efecto antiagregante y antitrombótico de algún compuesto, sino que también permite elucidar el mecanismo de acción de algunas patologías como la migraña.

CURSO DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

De esta manera un inhibidor de la agregación plaquetaria como el *partenólido* (obtenido de *Tanacetum parthenium*) ha resultado útil en la prevención y abordaje de cuadros migrañosos. El método usado es el de preparar las plaquetas por centrifugado de sangre total con el agregado de un anticoagulante como la heparina o citrato. Luego se separan las plaquetas por un nuevo centrifugado para tener una solución libre de proteínas plasmáticas y anticoagulante.

El PAF (Factor de Agregación Plaquetaria) es un fosfolípido que no sólo interviene en la agregación plaquetaria, sino que su presencia está relacionada a procesos asmáticos, alergias y shock anafiláctico. Se une a receptores específicos ubicados en la superficie de las plaquetas. Los inhibidores del PAF trabajan bloqueando la unión del PAF con el receptor sito en la plaqueta. Entre los más estudiados tenemos los ginkgólidos (*Ginkgo biloba*) y la kadsurenona de *Piper futokadsurae*.

ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE

La constatación en la reducción de los lípidos (colesterol y triglicéridos) en sangre sirve no solo como verificación de actividad hipolipemiente de una droga, sino también como constatación de reducción del índice de aterogenicidad (arteriosclerosis). Entre los mecanismos de acción propuestos tenemos:

- Inhibición de la síntesis de colesterol hepática por inhibición enzimática (HMG-CoA reductasa) involucrada en la síntesis de colesterol. Actúa por este mecanismo las estatinas, y entre las drogas vegetales los extractos de berenjena.
- Ácidos grasos poliinsaturados (aceites de pescado) los cuales incrementan la actividad de la lipoprotein-lipasa e inhiben la síntesis de VLDL-colesterol en hígado.
- Antioxidantes (flavonoides en especial) que actúan inhibiendo la peroxidación lipídica.
- Inhibición de la absorción de colesterol a nivel intestinal empleando secuestrantes de ácidos biliares como la colestiramina, la cual previene la reabsorción de ácidos biliares desde el sistema digestivo. De esta manera promueve la conversión de colesterol en ácidos biliares. Algunas fibras vegetales actúan de esta manera.

Los modelos de hiperlipidemia en animales se logran tras alimentar al mismo con una dieta rica en grasas durante un período de 3-6 meses. Si bien en un mes de dieta se puede medir el efecto hipolipemiente, recién entre 3-6 meses se puede medir correctamente el índice aterogénico. El índice aterogénico resulta de medir los cambios histopatológicos producidos en la aorta del animal luego de finalizado el ensayo.

Dietas ricas en azúcares también se emplean, en especial cuando se investiga el poder aterosclerótico en presencia de diabetes. La planta a investigar se administra junto con la dieta o posteriormente. Los animales que demostraron un comportamiento metabólico similar al humano son los conejos. La hiperlipidemia en ratas puede ser producida por dieta rica en grasas o más fácilmente por administración intraperitoneal (i.p) de Tritón (iso-octil-polioxi-etilene-fenol) en dosis de 400 mg/k. Los lotes de animales deben ser mayores a seis.

Indirectamente pueden medirse determinadas hormonas. Tanto testosterona como hormonas tiroideas se hallan en bajos niveles en casos de dietas hipergrasas. Por ejemplo, pacientes con infarto de miocardio registran bajos niveles de testosterona. El *malonil-aldehído* es un metabolito del ácido araquidónico formado durante el proceso de agregación plaquetaria. Recordar que las plaquetas están implicadas en los estadios iniciales de aterogénesis.

CURSO DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

El término inflamación involucra una compleja serie de respuestas (reparadoras, protectoras) frente a injurias tisulares, producidas por infecciones, procesos inmunológicos o injurias traumáticas directas. Agentes antiinflamatorios clásicos como la aspirina y otros AINE inhiben la vía de la ciclooxigenasa y la síntesis de prostaglandinas. Poseen acción antipirética también desde que las prostaglandinas intervienen en la generación de fiebre.

Sustancias antioxidantes cumplen un rol importante como agentes coadyuvantes, ya que los radicales libres cumplen un rol destructivo tisular durante el proceso inflamatorio. La actividad antiinflamatoria se ensaya generalmente a través de la inoculación en planta de pata u oreja de rata de una sustancia pro-inflamatoria (carragenina, formaldehído, caolina, dextran, ácido acético, aceite de crotón, pellet o granuloma de algodón, etc). A continuación se administra el extracto a investigar y posteriormente se hace una medición por pletismografía digital.

Para realizar estudios comparativos con drogas sintéticas, se emplea indometacina 10 mg/k vía oral (inhibidor de ciclo-oxigenasa); difenhidramina (antihistamínico) a razón de 1 mg/k vía i.p.; metiserghida (antiserotonina) en base a 100 microgr/k vía i.p.; o fenilbutazona a razón de 150 mg/k.

Algunos ensayos emplean ratas adrenalectomizadas a efectos de eliminar mecanismos que involucren el eje hipófiso-adrenal. Otros ensayos emplean ratones o ratas con artritis inducida por inyección intradérmica en una pata de 0,025 ml de gérmenes muertos de *Mycobacterium tuberculosis* en parafina líquida

ACTIVIDAD ANALGÉSICA

Algunos de los métodos descritos para actividad antiinflamatoria también pueden ser de utilidad para evaluar actividad analgésica. La aspirina se sabe actúa por medio de la vía de la ciclo-oxigenasa, pero no nos sirve para evaluar una acción analgésica central que pueda involucrar sustancias opioides. Recordemos que a nivel cerebral existen receptores opioides específicos: δ (delta), η (kappa) y μ (mu) los cuales pueden ser activados por endorfinas, narcóticos o hipnosedantes.

Compuestos como el paracetamol (acetaminofen) trabajan sobre ciclo-oxigenasa pero únicamente a nivel cerebral. La actividad analgésica evalúa la capacidad de un extracto vegetal para evitar la transmisión del dolor al SNC, o disminuir sensaciones primarias (tacto, vibración, etc). La sensación de dolor es difícil de medir o cuantificar debido a la subjetividad inherente a la persona o al hecho en sí. En experiencias *in vivo* existen algesímetros que miden la escala de dolor del animal.

Los métodos para producir dolor pueden ser térmicos, mecánicos, químicos, eléctricos o isquémicos.

- Pruebas de Contorsión: Se administra el extracto previo a una inyección intraperitoneal de 10 ml/k de peróxido de benzoilo al 10%. Otras sustancias usadas son ácido acético (1-3%) o benzoquinona (0,2 mg/ml) también ambos por vía i.p. Se observa por espacio de 15 minutos, el número de contracciones abdominales.
- Prueba de Inmersión de la Cola: Se sumerge 1/3 de la cola del ratón a un medio líquido caliente (51°). Se mide el tiempo de reacción del animal después de administrar el extracto.

TALLER DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

- Prueba del Plato Caliente: Se mide el tiempo de resistencia de un ratón sobre un plato caliente (el animal salta, se lame, trata de escapar, etc).

Cuando se pueda sospechar de un efecto analgésico central se trabajará en el test con naloxona, un conocido antagonista opioide, la cual se administra previamente al extracto.

ACTIVIDAD ANTIFERRIL

Los test antipiréticos se llevan a cabo comprobando el efecto de un extracto sobre hipertermia en ratas inducida por pirógenos como la inyección de levadura de cerveza. Se administra 1 ml/k vía subcutánea. A las 10-15 hs se toma la temperatura rectal del animal. Se testea la actividad *versus* aspirina 100 mg/k vía i.p.

ACTIVIDAD ANTIASMÁTICA

Mediadores de inflamación como los leucotrienos y el PAF están relacionados con los procesos de broncoconstricción y asma. Agonistas beta-adrenérgicos también. Extractos que inhiban ambos parámetros se consideran coadyuvantes de la terapia antiasmática. La presencia de PAF en pulmón activa la cascada del ácido araquidónico generando tromboxanos e histamina. Entre los antagonistas del PAF tenemos: ginkgólidos del *Ginkgo biloba*, lignanos (kadsurenona, nectandrin A y B de *Nectandra rigida* y el burserano de *Bursera microphylla*).

La inhibición de la vía de la *5-lipooxigenasa* a partir del ácido araquidónico permite obtener una reducción en la formación de leucotrienos pro-inflamatorios (LTB-4) y espasmogénicos tanto a nivel vascular como bronquial (LTC-4, LTD-4, LTE-4). Los receptores beta-2-adrenérgicos se concentran de preferencia en pulmón, estando involucrados en los procesos de broncodilatación. El salbutamol es un agonista de esta vía. Se diferencian de los beta-1 cuyo radio de acción involucra actividad simpaticomimética alrededor del corazón.

En la práctica se trabaja con músculo liso bronquial o traqueal aislado y se observa la actividad de los extractos y sus mecanismos de acción (anticolinérgicos, antihistamínicos, beta-2-agonistas, PAF antagonistas, etc). Por ejemplo para evaluar un agonista beta-2 se trabaja conjuntamente con un bloqueante beta. Entre los bloqueantes beta (para beta 1 y beta 2) tenemos el propranolol, timolol y nadolol. De ahí su contraindicación en asma.

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Drogas hipoglucemiantes sintéticas como las sulfonilureas actúan aumentando la secreción de insulina, en tanto las biguanidas solo actúan en presencia de insulina residual. Para comprobar la actividad hipoglucemiante se produce una hiperglucemia o diabetes experimental en el animal a través de la administración de *alloxano* (derivado de la urea), *glucagón* o *estreptozotocina* (nitrosoureido citotóxico obtenido por fermentación de *Streptomyces achromogenes*).

TALLER DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

El alloxano (150 mg/k) se aplica al 5% en agua destilada en dosis simple sobre vena auricular en conejos, o por vía i.p. en ratas y ratones. La estreptozotocina se administra por vía i.p. en dosis de 150 mg/k en ratones y 80 mg/k en ratas. A los 4 -7 días se desarrolla la diabetes en el animal. Suele causar una necrosis selectiva de las células beta en islotes pancreáticos. Se ensaya en ratas, conejos, ratones y perros.

El índice diabetógeno (glucemia en ayunas) por alloxano puede ser moderado (180-250 mg/ml) o severo (> 250 mg/ml). A continuación se administra el extracto vegetal a explorar. En los casos severos, el resultado de la diabetes experimental por alloxano es equiparable a una pancreatectomía, donde sulfonilureas como la tolbutamida presentan muy poca actividad hipoglucemiante. Recordar que la prueba puede modificarse en presencia de diuréticos. Se emplea como control generalmente tolbutamida y en otras ocasiones la clorpropamida. Muchos ensayos conviene iniciarlos en animales normoglucémicos para en una segunda etapa pasar al modelo hiperglucémico.

ACTIVIDAD SEDANTE - ANSIOLÍTICA

Existen muchas plantas que demostraron actuar de manera similar a las benzodiacepinas sintéticas, interactuando en la mayoría de los casos sobre receptores GABA-A. Entre ellas tenemos la manzanilla, la pasionaria, la valeriana, etc. La actividad sedante de un extracto vegetal se basa en algunas sencillas pruebas.

Prueba de la placa agujereada: Se coloca en la jaula una tabla con 16 agujeros. Se mide el carácter de curiosidad del animal en la medida que introduzca su cabeza en cada agujero. Se mide el número de agujeros explorados por minuto durante 5 minutos y se compara con otros sedantes (benzodiacepinas). El sedante (vegetal o sintético) producirá una disminución en la curiosidad del animal.

Prueba de Rota-Rod: Evalúa los reflejos del animal haciendo equilibrio sobre un eje giratorio (10 rpm) durante 3 minutos. Si se administra un sedante, la caída y pérdida del equilibrio será rápida.

Prueba de la chimenea: Se coloca el ratón en un tubo cilíndrico de 30 cm de profundidad. Se lo empuja hasta el final. Se coloca de pie el cilindro y se mide el tiempo que tarda el ratón en escapar del fondo del tubo.

ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE

Se logra mediante la administración i.p. de pentetrazole (80-120 mg/k) en ratones, lo cual provoca convulsiones clónicas. Cuando se ensaya el extracto vegetal se medirá (versus control con anticonvulsivantes sintéticos): tiempo de inicio de convulsión, número de animales convulsionando, episodios de convulsiones (número) acaecidos en 10 minutos, número de animales agonizantes en el lote tratado. Los extractos de valeriana resultaron en estos tests excelentes anticonvulsivantes.

CURSO DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

ACTIVIDAD HIPNÓTICA

Muy ligada a la actividad sedante. En este caso se induce el sueño por medio de la administración de barbitúricos (pentobarbital = 55 mg/k, hexobarbital = 35 mg/k). Los extractos testeados medirán el tiempo que tarda el animal en comenzar a dormir y si el tiempo total de sueño se prolonga con el agregado del extracto.

ACTIVIDAD SEXUAL

Test de actividad antifertilidad: Se utilizan ratas femeninas vírgenes a las cuales se les administra el extracto vegetal durante varios días. Indicadores de *estrogenicidad* pueden ser medidos por la observación de cornificación vaginal o por el incremento del peso del útero. *Anti-estrogenicidad* puede ser medida a través del bloqueo que induzca el extracto vegetal sobre una inyección de estrógenos sintéticos. Actividad *antigonadotrófica* es medible a través del nivel de hormonas en sangre y a nivel pituitario. En casos de actividad *antiimplante* se administra el extracto vegetal por vía oral durante 1-5 días de haber sido inseminados. Se hace laparatomía al 10º día bajo anestesia, y se observa el número de implantes (si llegaron a implantarse correctamente, si presentan deformidades, etc).

Test de actividad afrodisíaca: Se mide en ratas macho a través del número de cópulas del animal luego de suministrado el extracto *versus* un lote de animales normales (no recibieron ningún producto). En estos casos es muy importante establecer la edad de los animales a ser tratados. Por ejemplo la maca (*Lepidium meyenii*) demostró dicha actividad. Otras especies lograron mejorar los índices de *fecundidad* (aumento de la espermatogénesis) como lo ha demostrado el jengibre. Una técnica empleada *in vitro*, es por medio de la estimulación en la liberación de óxido nítrico a partir de tiras de cuerpo cavernoso de ratas, uno de los métodos evidenciados por el sildenafil (VIAGRA®). Entre las plantas autóctonas que demostraron un patrón de acción similar cuentan la muña muña (*Satureja parvifolia*), cola de quirquincho (*Lycopodium saururus*) y baila bien (*Haploppapus rigidus*).

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Para medir la toxicidad de una planta o extracto se recurre con frecuencia a la prueba de *Artemia salina*. Se trata de un pequeño camarón de mar (crustáceo que habita la bahía de San Francisco) cuyas larvas (nauplios) son sensibles a gran variedad de sustancias. Los huevos de la *Artemia salina* se venden como alimento de peces. Es un organismo completo en cuanto a sistemas enzimáticos se refiere. Se emplea no solo para evaluar la toxicidad de un vegetal, sino también como método de comprobación de actividad para algunos pesticidas, anestésicos, micotoxinas y toxinas de dinoflagelados.

La actividad observada en el test de *Artemia salina* se expresa como toxicidad a los camarones (LC₅₀), es decir la dosis que mata al 50% de los camarones. No es un ensayo específico sino de toxicidad general, aunque sirve también para el análisis de actividad de muchos pesticidas. Se considera como citotóxico cuando la LC50 = 1000-2000 ppm (para extractos crudos) y < 200 ppm (para compuestos o sustancias puras).

TALLER DE PLANTAS MEDICINALES Y A.P.S

Toxicidad Aguda: Se administra por sonda orogástrica el extracto al ratón (previo pesado en balanza del animal) durante 7 días. Se observa erizamiento de pelos, exoftalmia, estado depresivo, disminución de peso, cambios en la posición de la oreja y cola y por último muerte si la hubiere. El método sirve para determinar la Dosis Letal 50 de una administración única (Dosis necesaria para matar al 50% del lote de animales ensayados).

Toxicidad Subaguda: Se evalúa a través de la administración del extracto por espacio de 30 días consecutivos. Después del mes se sacrifican los animales y se observan los órganos a efectos de verificar cambios histológicos debido a toxicidad.

Toxicidad Crónica: Se administra el extracto durante 90 días corridos y se verifica por autopsia cambios en los tejidos luego de los 90 días. No obstante, se van observando durante el correr de los días cambios en la actitud del animal, peso, control de sangre, etc.

Mutagenicidad: Test de Ames. Se realiza sobre la sensibilidad a sufrir cambios en la progenie en gérmenes como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o *Salmonella typhimurium*.

Teratogenicidad: Se ensayan extractos en ratas preñadas y se observan cambios morfoanatómicos en la progenie.