



Efecto gastroprotector de *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga y *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca

INTEGRANTES	FIRMA
Toso, R. E.....	
Toso, F.....	
Alvarez, H. L.....	
Marron, Y. M.....	
Neher, B. D.....	
Mondino, M. A.....	
Efecto gastroprotector de <i>Equisetum giganteum</i> L. n.v. cola de caballo, <i>Cortaderia selloana</i> (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, <i>Anthemis cotula</i> L. n.v. manzanilla amarga y <i>Atriplex undulata</i> D. Dietr. n.v. zampa blanca	

Aprobado.
Toso R.
Olivero F. Sosa.



Número de Proyecto:

Año:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1 Efecto gastroprotector de *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga y *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Básica - Aplicada - Desarrollo Experimental

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: FARMACOLOGÍA

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: SALUD ANIMAL

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS

Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos – FCV-UNLPam

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1. INTEGRANTES

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra ó Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Toso, Ricardo Enrique	Dr. Biología	II	D	Farmacología	Prof. Adj	9
Toso Federico	MV	-	I	Farmacología	Adscripto	7
Álvarez, Hebe Lina	Lic. Biología	-	I	CIDEF	Becaria CONICET	5
Neher, Barbara	Dra. Biología	-	I	CIDEF	Adscripta CIDEF	5
Mondino Mariela Ayalen	Estudiante	-	AI	CIDEF	Estudiante	2
Marrón Yolanda	Estudiante	-	AI	CIDEF	Adscripta CIDEF	2

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prórroga)

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2017 **FINALIZACIÓN:** 31 / 12 / 2020

4. RESUMEN del PROYECTO:

El Banco de Extractos Vegetales (BEV) del Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la FCV, UNLPam, cuenta con una colección de 180 extractos. Estudios previos llevados a cabo para evaluar la presencia de actividad gastroprotectora utilizando 18 extractos del BEV, permitieron identificar ejemplares con esta propiedad. En este proyecto se continuarán evaluando especies empleando distintos modelos de inducción de úlceras. La presencia de efectos gastroprotectores se valorará inicialmente induciendo úlceras por estrés provocado por hipotermia e inmovilización en ratones. Este modelo es sensible para detectar la presencia de actividad gastroprotectora, sin embargo, considerando que las úlceras poseen una etiología multifactorial, resulta insuficiente para determinar los alcances terapéuticos de cada planta. Para obtener mayor información sobre las acciones farmacológicas involucradas en la respuesta gastroprotectora en los extractos que exhiban esta propiedad, se realizarán ensayos induciendo úlceras con agentes químicos y farmacológicos. Se ensayarán extractos hidroalcohólicos de *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga y *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca. Aquellos que exhiban actividad antiulcerogénica promisorias serán sometidos a estudios toxicológicos. Los resultados obtenidos permitirán inferir el potencial terapéutico de estas plantas.

4.1 Palabras claves: Gastroprotector / Extractos vegetales / *Equisetum giganteum* / *Cortaderia selloana* / *Anthemis cotula* / *Atriplex undulata*

Gastroprotective effect of *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga and *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca

The vegetable extract bank of the Pharmacology Investigation and Development Centre at the Faculty of Veterinary Medicine, National University of La Pampa counts with a collection of 180 extracts. Previous studies carried out at the Centre identified 18 extracts with animal gastro-protector activity. During the present work, the gastro-protected activities of different extracts are going to be evaluated in an animal model inducing ulcer by stress as consequence of hypothermia and immobilisation in rats. The described model is sensible to evaluate the gastroprotective activity nevertheless considering that the origins of ulcers are multifactorial, it results insufficient to determine the therapeutic range of each plant. In order to obtain information of the pharmacology actions involved in the gastroprotective activities of the extracts, are going to be assayed inducing ulcers with chemical and pharmacological agents. Hydroalcoholic extracts of *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga and *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca is going to be checked. Those extract that showed anti-ulcerogenic activity are going to be subjected to toxicological studies. The obtained results would allow inferring the potential therapeutic effect of the plants.

Keywords: gastroprotective, vegetable extract, *Equisetum giganteum*, *Cortaderia selloana*, *Anthemis cotula*, *Atriplex undulata*

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA.

La búsqueda de plantas medicinales se basa principalmente en la información etnobotánica. Este método es considerado el más eficaz ya que se ha comprobado una notable precisión en los usos populares. Sin embargo, parte de esta información se ha perdido y muchas otras especies vegetales, que podrían contener grupos químicos de interés farmacológico, no han sido utilizadas. Por esta razón, los métodos de prospección al azar son empleados por la industria farmacéutica con la finalidad de obtener nuevos principios activos (Cox y Balick, 1994; Khafagi y Dewedar, 2000). Estos estudios pueden llevarse a cabo ensayando sistemáticamente distintas plantas para determinar la presencia de actividad farmacológica utilizando modelos experimentales *in vivo* o *in vitro*.

Utilizando esta metodología en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam se llevan a cabo búsquedas sistemáticas de plantas que prevengan la formación de úlceras gástricas. Para llevar a cabo estos estudios el CIDEF cuenta con un Banco de Extractos Vegetales (BEV) donde se conservan almacenadas muestras de extractos hidroalcohólicos de 180 plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa, conservadas en condiciones de ser utilizadas en modelos *in vivo* e *in vitro* (Toso, et al., 2007).

Ensayos previos han aportado valiosa información permitiendo seleccionar especies con actividad promisorio como *Gnaphalium gaudidraudianum* (Toso y Boeris, 2005^a), *Jodina rhombifolia* (Toso y Boeris, 2005^b), *Lippia turbinata*, *Plantago lanceolata* y *Ruta chalepensis* (Toso et al., 2006) entre otras. Estos estudios se desarrollaron empleando un modelo de inducción de úlceras por estrés provocado por hipotermia e inmovilización en ratones (Toso y Skliar, 2000). Este modelo provoca úlceras como consecuencia de una serie de procesos fisiopatológicos que comienzan con la

disminución del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Jacobson, 1992). La escasa irrigación afecta a los factores citoprotectores mediados por las prostaglandinas (Robert, 1979). La reducción en la secreción de mucus y bicarbonato provoca el debilitamiento progresivo de la barrera mucosa gástrica (Murakami et al., 1985; Tackeuchi et al., 1999). Estos acontecimientos son acompañados por un aumento de la motilidad gástrica que favorece el desprendimiento de mucus por un efecto erosivo mecánico permitiendo que el ácido clorhídrico dañe la pared del estómago (Lin y Tan, 1994).

Además del estrés, las úlceras pueden ser el resultado de alteraciones en la secreción del ácido clorhídrico, la disminución de los factores citoprotectores como efecto secundario de los Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y la presencia de *Helicobacter spp.* como causa única o asociado a otra etiología (Hernández y Gollón, 2002). También se presentan en animales que ingieren alimentos inadecuados, en exceso, demasiado calientes o congelados. Pero independientemente del factor desencadenante, para que se lesione la mucosa gástrica el agente injurioso debe romper el equilibrio entre los mecanismos defensivos, que están representados finalmente por la barrera mucosa y llegar a la pared del estómago (Zolezzi, 1998). Esta característica fundamentó la elección del método de inducción de úlceras por estrés en ratones para realizar las búsquedas al azar. Todas aquellas plantas cuyo mecanismo de acción se relacione con el aumento de la síntesis de prostaglandinas y la secreción de mucus y bicarbonato, la disminución de la secreción de ácido y de la motilidad gástrica, aumenten el pH intragástrico o simplemente tengan un efecto protector directo sobre la mucosa gástrica, expresarán un cierto grado de actividad gastroprotectora al ser ensayadas con el modelo de estrés.

Como puede observarse, el modelo de estrés resulta sensible para detectar plantas con actividad gastroprotectora, pero la información obtenida no es suficiente para inferir sus alcances terapéuticos. Debe considerarse que de acuerdo al factor desencadenante de la lesión gástrica, algunos tratamientos resultarán más efectivos que otros. Por ejemplo, en úlceras provocadas por estrés son efectivas las drogas con acción anticolinérgica y citoprotectoras combinadas o no con ansiolíticos. Pero éstas, son de moderado efecto cuando se presentan alteraciones en la secreción del ácido clorhídrico o cuando se inhibe la síntesis de prostaglandinas por efecto de los AINEs. En estos casos se requiere de la administración de inhibidores de la bomba de protones o antihistamínicos H₂. La presencia de *Helicobacter spp.* determinará la necesidad de instaurar un tratamiento combinado de antibióticos con alguna de las drogas mencionadas (Brunton, 1996; Filingier, 2000). Los inhibidores de la bomba de protones y los anti H₂ también son efectivos en el tratamiento de las úlceras por estrés al elevar el pH gástrico, contribuyendo de esta manera a mantener la integridad de la debilitada barrera gástrica.

Los efectos secundarios de estos agentes antiulcerosos limitan su empleo en tratamientos prolongados. Por esta razón resulta de interés investigar la acción de plantas con esta actividad ya que se ha demostrado que poseen compuestos bioactivos que podrían calificarlas para su uso clínico. Estudios fitoquímicos permitieron identificar distintos principios activos responsables de esta actividad y elucidar sus mecanismos de acción. Entre otros pueden mencionarse los flavonoides (Di Carlo et al., 1993; Hammad y Abdala, 1997; Martín et al., 1998), lactosas sesquiterpénicas (Giordano et al., 1997; Herz y Sosa, 1998), taninos y alcaloides (Cola Miranda et al., 2006) y aceites esenciales (Hiruma Lima et al., 2002). El flavonoide hipoletín-8-glucósido, presente en el género *Sideritis* (Alcaraz y Houlst, 1985) y los glucósidos fenólicos de la *Filipendula ulmaria* poseen actividad antiinflamatoria y citoprotectora gástrica. Los curcuminoídeos de la *Curcuma longa* han demostrado selectividad enzimática sobre la vía de la COX 2 protegiendo a la mucosa gástrica sin afectar la síntesis de prostaglandinas mediada por COX 1.

El empleo de agentes químicos como el etanol lesiona la mucosa por una acción directa y por mecanismos oxidativos. Estas lesiones pueden prevenirse por la PGE₂ que actúa modificando la secreción ácida y estimulando la secreción de mucus. También se ha demostrado que pueden ser prevenidas por compuestos con propiedades antioxidantes como el flavonoide quercetina, presente en las plantas (Güntner et al., 1999; Sandoval et al., 2006).

Es bien conocida la diferente especificidad de los AINEs para inhibir la enzima COX y concretamente, la mayor o menor selectividad para actuar sobre cada una de las dos isoformas identificadas de esta enzima, COX-1 y COX-2. Así piroxicam, sulindac e indometacina son inhibidores más selectivos de COX-1, molécula involucrada en la producción de PGs con funciones tales como protección gástrica, homeostasis vascular o función renal. Las lesiones gástricas inducidas por estos fármacos pueden ser prevenidas por drogas que reducen la secreción ácida tales como el omeprazol y misoprostol (Cavallini et al., 2006). Se ha comprobado que compuestos vegetales como el canferol (Goel et al., 1996) y el hipoletín-8-glucósido producen efectos citoprotectores similares a las prostaglandinas (Alcaraz y Hoult, 1985). La administración previa de indometacina en ratones permite determinar si los efectos antiulcerosos producidos por los extractos a ensayar están mediados por las prostaglandinas.

Como fue mencionado, el estrés produce un trastorno en la motilidad gástrica que puede ser antagonizado por agentes antiespasmódicos - anticolinérgicos como atropina e hioscina al reducir la acidez y los espasmos. Algunos compuestos presentes en las plantas que poseen un grupo α -metileno- γ -butirolactona poseen estas propiedades (Giordano et al., 1997). Experimentalmente, se puede demostrar este mecanismo de acción empleando atropina como droga control.

Los agentes que actúan protegiendo la mucosa gástrica como el sucralfato protegen de los agentes físicos y químicos que lesionan en forma directa a la mucosa protegiendo del ácido y de las enzimas. Mucílagos y pectinas vegetales tienen esa acción protectora (Gorriti Gutiérrez et al., 1998).

Este breve resumen evidencia que la evaluación de los extractos vegetales empleando distintos modelos experimentales, permitirá en este trabajo inferir los mecanismos de acción involucrados en la respuesta gastroprotectora. Se propone comprobar inicialmente si *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga y *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca previenen las úlceras inducidas por estrés. Se aplicarán también modelos de inducción de daño gástrico empleando agentes químicos y farmacológicos. Se espera obtener información sobre el valor terapéutico de estas plantas y los posibles mecanismos de acción involucrados en la respuesta gastroprotectora.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el/los INTEGRANTE/S del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Capítulos de libros

- CAPITULO: RICARDO ENRIQUE TOSO, MARIO IGNACIO SKLIAR / LA FARMACOGNOSIA EN EL ESTUDIO SISTEMÁTICO DE LAS PLANTAS MEDICINALES / PARA EL LIBRO: HILTON MACHADO MAGALHAES; FARMACOLOGÍA VETERINARIA, TEMAS ESCOLHIDOS II / Ed única; GUAIBA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL; EDITADO POR LIVRARIA E EDITORA AGROPECUARIA; (1999), Pag 107 - 136. I.S.B.N. 85-85347-49-X.
- CAPITULO: MARIO IGNACIO SKLIAR, RICARDO ENRIQUE TOSO / DESCUBRIMIENTO Y ENSAYO DE NUEVAS DROGAS EN MEDICINA VETERINARIA / PARA EL LIBRO: HILTON MACHADO MAGALHAES; FARMACOLOGÍA VETERINARIA, TEMAS ESCOLHIDOS III / Ed única; GUAIBA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL; EDITADO POR LIVRARIA E EDITORA AGROPECUARIA; (2002), Pag 75 - 87. I.S.B.N. 85-85347-96-1.
- CAPITULO: RICARDO ENRIQUE TOSO, MÓNICA BOERIS, MARIO IGNACIO SKLIAR, / PRODUCTOS NATURALES: UN CAMPO DE ACCIÓN PROMISORIO PARA LA MEDICINA VETERINARIA / PARA EL LIBRO: HILTON MACHADO MAGALHAES; FARMACOLOGÍA VETERINARIA, TEMAS ESCOLHIDOS III /

Ed unica; GUAIBA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL; EDITADO POR LIVRARIA E EDITORA AGROPECUARIA; (2002), Pag 109 -120. I.S.B.N. 85-85347-96-1

- CAPITULO: RICARDO ENRIQUE TOSO, MIRTA TORIBIO / RECURSOS TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA AFECCIONES HEPÁTICAS / PARA EL LIBRO: HILTON MACHADO MAGALHAES; FARMACOLOGÍA VETERINARIA, TEMAS ESCOLHIDOS III / Ed unica; GUAIBA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL; EDITADO POR LIVRARIA E EDITORA AGROPECUARIA; (2002), Pag 121 - 134. I.S.B.N. 85-85347-96-1

Trabajos publicados

- TOSO, R. E.; SKLIAR, M.I. / "EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* SOBRE LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS POR ESTRÉS EN RATAS" / CIENCIA VETERINARIA / ISSN 1515-1883 / 1: 9-14. (1999).
- TOSO, R. E.; SKLIAR, M.I. / HISTOFISIOPATOLOGIA Y TRATAMIENTO DE LA ULCERA GÁSTRICA. USOS DE DROGAS VEGETALES. / ANUARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS / ISSN 1514-9242 /2: 7 - 21. (2000).
- TOSO, R. E.; SKLIAR, M.I. / EFECTO DE LA INDOMETACINA SOBRE LA CITOPROTECCIÓN DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* CONTRA ULCERAS GÁSTRICAS INDUCIDAS POR ESTRÉS EN RATONES / CIENCIA VETERINARIA / ISSN 1515-1883 /2: 16 - 20 (2000).
- TOSO, R. E.; SKLIAR, M. I. / EFECTO DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* SOBRE EL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL EN RATONES / FITOCIENCIA / 2: 10 - 12, (2000) .
- TOSO, R. E.; SKLIAR, M. I. / AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA PRESENTES EN *CENTAUREA SOLSTITIALIS* / CIENCIA VETERINARIA / ISSN 1515-1883 / 4: 17 - 27 (2002).
- TOSO, R. E.; SKLIAR, M. I.; VERNA, E. / MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR EL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL EN RATONES / CIENCIA VETERINARIA / ISSN 1515-1883 / 4: 44 - 48 (2002).
- TOSO, R. E.; SKLIAR, M. I. / ESTUDIO DE LA ACCION CITOPROTECTORA GÁSTRICA DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* / ACTA FARMACÉUTICA BONAERENSE / ISSN 0326-2383 / 22, 1: 27-32 (2003).
- BOERIS, M. A.; TOSO, R. E.; SKLIAR, M. I. / ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *SALPICHROA ORIGANIFOLIA* / ACTA FARMACÉUTICA BONAERENSE / ISSN 0326-2383 / 23 N° 2 (2004).
- TOSO, R. E.; TORIBIO, M. S.; MENGELLE, P.; BOERIS, P. / PLANTAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA, CON ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA Y ANTIESPASMÓDICA / InVet / ISSN 1514-6634 / 9: (2007).
- STEIBEL, P. E.; TROIANI, H. O.; ORIANI, D. S.; ARDOINO, S. M.; TORIBIO, M. S.; BOERIS, M. A.; TOSO, R. E. / BANCO DE EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS NATIVAS Y NATURALIZADAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA / AVANCES DE LA FARMACOBOTÁNICA EN LATINOAMERICA (2004 - 2007) / 1era. EDICIÓN. / ISBN 978-987-05-2933-0 / Pag. 61 (2007).

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

- "ELABORACIÓN DE FITOFÁRMACOS INYECTABLES A PARTIR DE TINTURAS VEGETALES" / FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPam. Res. 092.99 / FECHA DE ALTA: 1/07/99 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/2000 / EVALUACIÓN: INTERNA Y EXTERNA.
- "EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE MEDICAGO SATIVA SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL Y EL TIEMPO DE VACIADO GÁSTRICO" / FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPam. Res. 028.01 / FECHA DE ALTA: 1/01/01 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/02 / EVALUACIÓN: INTERNA Y EXTERNA.
- "ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS DE EXTRACTOS DE FLORES DE CENTAUREA SOLSTITIALIS" / UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR / DIRECTOR: SKLIAR, M. I. / FECHA DE ALTA: 1/01/01 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/04 / EVALUACIÓN: EXTERNA.
- "ESTUDIOS DE LOS EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS PRODUCIDOS POR EXTRACTOS DE SALPICHROA ORIGANIFOLIA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA" / FACULTAD DE CIENCIA VETERINARIAS, UNLPam / DIRECTOR: MARIO IGNACIO SKLIAR / FECHA DE ALTA: 1 DE ENERO DE 2002 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31 DE DICIEMBRE DE 2004 / EVALUACIÓN: INTERNA Y EXTERNA
- "ASPECTOS BOTÁNICOS, ECOLÓGICOS, ANTROPOLÓGICOS Y COGNITIVOS DE PLANTAS MEDICINALES NATIVAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA. CONTRIBUCIÓN A LA ECOLOGÍA BIOCULTURAL Y A LA AGROINDUSTRIA DE LA REGIÓN" / GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE FÁRMACOS (CIDEF). RESOLUCIÓN: 001/04 CS
- "DETERMINACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE PLANTAS NATIVAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA". FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPam. Res. 133/05 CD / FECHA DE ALTA: 1/01/05 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/06 / EVALUACIÓN: EXTERNA. PROYECTO PRORROGADO HASTA EL 31/12/07 Res CD 048/2007.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Problema científico abordado:

El tratamiento de las úlceras gástricas se lleva a cabo empleando antagonistas H₂ como la cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina y los inhibidores de la bomba de protones, como el omeprazol y lanzoprazol. Estas drogas tienen efectos secundarios que en algunos cuadros clínicos determinan la suspensión del tratamiento. Estas drogas, además producen efecto rebote, aumentando la secreción de ácido clorhídrico al retirar los tratamientos. Por otro lado no deben reducir sensiblemente la secreción ácida, ya que ésta tiene funciones digestivas y además actúan controlando la proliferación de microorganismos patógenos. Con el objeto de minimizar estos efectos secundarios, se emplean con éxito algunos extractos vegetales, pero éstos tienen un efecto menor que las drogas sintéticas mencionadas anteriormente. Este hecho, justifica continuar la búsqueda sistemática de extractos con efecto gastroprotector con la finalidad de hallar drogas más efectivas que puedan ser administradas con escaso riesgo en tratamientos prolongados.

Objetivos:

- Determinar la presencia de efecto antiulcerogénico en *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga y *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca induciendo úlceras gástricas por estrés en ratones.
- Obtener información sobre los posibles mecanismos de acción involucrados induciendo úlceras empleando agentes químicos y farmacológicos.
- Determinar la DL50 tóxica de los extractos que muestren actividad gastroprotectora.

Hipótesis:

- Todos los extractos ensayados presentarán algún grado de efecto gastroprotector como consecuencia de la presencia de flavonoides cuando se induzcan úlceras por estrés provocados por hipotermia e inmovilización.
- Los extractos ensayados no evidenciarán efecto gastroprotector en todos los modelos inductores de úlceras que se emplearán.
- Los ensayos de toxicidad determinarán que los extractos poseen un alto índice terapéutico, compatible con el uso clínico sin riesgos.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

Obtención de los extractos

Los extractos hidroalcohólicos de *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo, *Cortaderia selloana* (Schult & Schltz. f.) n.v. cortadera, *Anthemis cotula* L. n.v. manzanilla amarga y *Atriplex undulata* D. Dietr. n.v. zampa blanca, serán provistos por el Banco de Extractos Vegetales del CIDEF. Los extractos fueron preparados y conservados por el método descrito por Toso, et al., (2007).

Animales de experimentación

Se utilizarán ratones *Mus musculus* de 25 – 28 g de peso provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. Los animales serán sometidos a ayuno completo 12 h antes de los ensayos utilizando jaulas especiales para evitar la coprofagia.

Preparación de las soluciones de extractos y fármacos de referencia. Dosis utilizadas en los distintos ensayos.

El extracto hidroalcohólico proveniente de 1 g de partes aéreas desecadas de la planta será resuspendido hasta un volumen de 0,5 ml en un vehículo compuesto por una mezcla de carboximetilcelulosa al 0,1 % y Tween 80 al 0,05 % (1:1, v/v) (Ex) y se administrará vía oral con una sonda gástrica.

Los fármacos de referencia atropina, ranitidina, omeprazol y sucralfato serán administrados vía oral en dosis de 0,05 mg/kg, 50 mg/kg, 20 mg/Kg y 400 mg/kg respectivamente. Todas las soluciones serán preparadas inmediatamente antes de ser administradas.

En todos los ensayos se utilizaran grupos controles a los que se les administrará vía oral el Ex en un volumen de 0,5 ml.

Inducción de úlceras gástricas por estrés

Se empleará el método descrito por Yesilada et al. (1999) modificado por Toso et al. (2002).

Los extractos, el Ex y la drogas de referencia, atropina, ranitidina y omeprazol se administrarán intragástricamente a los ratones 60 min antes de someterlos a la hipotermia e inmovilización. Pasadas 4:30 h los animales serán sacrificados con monóxido de carbono.

Los estómagos se insuflarán con agua destilada y fijarán en formol al 10 % durante 12 h. Se abrirán por la curvatura mayor y se tomarán fotografías de la superficie. El área ulcerada (AU) se medirá por medio de un analizador de imágenes y expresará en mm². El porcentaje de inhibición logrado por los extractos en los distintos grupos tratados en relación al Grupo control se calculará utilizando la fórmula $[(AU_{\text{Grupo control}} - AU_{\text{Grupo tratado}} / AU_{\text{Grupo control}}) \times 100]$. El efecto de las drogas de referencia y de los extractos será comparado con respecto al grupo testigo utilizando el test t de Student. El Grupo Control, Grupo Atropina, Grupo Ranitidina, Grupo Omeprazol y los Grupos tratados con cada uno de los 5 Extractos estará conformado por 5 ratones.

Inducción de úlceras gástricas por método farmacológico (indometacina)

Se utilizará el método descrito por Lee et al. (1971). Los extractos, el Ex y las drogas de referencia, atropina, ranitidina y omeprazol se administrarán intragástricamente a los ratones 60 min antes de la administración oral de indometacina. La indometacina se disolverá en NaHCO₃ al 4 % y administrará en dosis de 20 mg/kg a una concentración de 8 mg/ml. Los animales se sacrificarán 6 h después de la administración de indometacina con monóxido de carbono y se extraerán los estómagos para evaluar los resultados utilizando los procedimientos ya descritos.

Inducción de úlceras gástricas por método químico (etanol)

Se utilizará el método de Robert et al. (1979). Los extractos, el Ex y las drogas de referencia, ranitidina, omeprazol y sucralfato se administrarán oralmente 60 minutos antes de administrar 1 ml de etanol al 75 % por la misma vía. Después de otros 60 min los ratones se sacrifican con monóxido de carbono y se extraen los estómagos para evaluar los resultados utilizando los procedimientos ya descritos.

Estudios complementarios

Determinación del pH gástrico de los ratones

La determinación se realizará según el método descrito por Murakami et al. (1985). Un grupo será administrado con los Ex y otros dos con atropina, ranitidina y omeprazol respectivamente como drogas de referencia. El resto de los grupos será administrado con cada uno de los extractos de las plantas. Cada grupo estará conformado por 5 ratones. Una hora después de administrado los extractos, los animales serán sacrificados. Se extraerán los estómagos, se abrirán por la curvatura mayor y se colocará una tira de papel indicador de pH sobre la porción glandular de la mucosa gástrica. El aumento del pH gástrico de los animales tratados será comparado respecto a animales administrados solamente con los excipientes y evaluado por test t de Student.

Determinación del pH de los extractos

Los extractos serán preparados con los excipientes de igual forma que la indicada para la administración. El pH será medido utilizando un peachímetro digital.

Los valores serán comparados utilizando el test "t" de Student con los obtenidos en forma intragástrica con los mismos extractos.

Determinación del efecto sobre la motilidad gástrica

Método radiológico: Se utilizará el método descrito por Toso et al. (2002). Los animales se dividirán en grupos de 5 ratones cada uno y serán tratados con los extractos de igual forma a la explicada para la inducción de úlceras por indometacina. Transcurridos 30 minutos de la administración del extracto los animales serán administrados *per os* con 0,5 ml de una solución de 13 g de sulfato de bario en 25 ml de agua destilada. Inmediatamente y cada 10 minutos se tomará una radiografía. Un grupo de animales será tratado con hiosciamina y otro con atropina como drogas de referencia. Los resultados serán analizados comparando el tiempo de vaciado gástrico y progreso del contenido intestinal respecto al grupo control. La diferencia entre los tiempos de vaciado gástrico y el tiempo de evacuación total de la sustancia radiopaca de los grupos tratados con las drogas de referencia y los extractos serán evaluados utilizando el test t de Student.

Estudios de toxicidad aguda y subaguda

Método para determinación de DL50 con dosis tóxica aguda: se utilizarán grupos de 10 ratones, 2 grupos de ratones machos y dos grupos de hembras. Se administrarán con una dosis única 10 veces superior a la dosis terapéutica. En caso que no se detecte toxicidad se elevará a 20 veces.

Método para determinación de DL50 con dosis tóxica subaguda: Utilizando el mismo esquema explicado para toxicidad aguda, se administrará diariamente una dosis cinco veces superior a la terapéutica durante 15 días consecutivos.

Los animales sobrevivientes serán sacrificados con monóxido de carbono y se enviarán muestras de cerebro, riñón, hígado, bazo y pulmón al laboratorio de histopatología.

Se emplearán 10 ratones por grupo.

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Resulta de interés clínico el hallazgo de plantas que expresen propiedades gastroprotectoras por varios mecanismos. Una planta que posea más de un mecanismo de acción o formulaciones que contengan extractos de dos o más plantas con diferentes mecanismos de acción, contribuirían a instaurar un tratamiento con mayores posibilidades de éxito en aquellos casos donde la etiología es confusa. Por ejemplo, en los equinos de deportes sometidos a esfuerzos, es común que se produzcan úlceras por estrés. Pero también éstas pueden estar asociadas a *Helicobacter pylori*, mala alimentación o trastornos de la motilidad o secretorios. En muchos de estos casos, es difícil lograr un diagnóstico de certeza. Por lo tanto, una formulación que tenga actividad sobre estas etiologías en conjunto, con escasos efectos secundarios, sería un avance en el tratamiento de las úlceras gástricas.

En la actualidad el uso de drogas vegetales elaboradas como fitofármacos tienen una buena aceptación en el mercado. La industria farmacéutica ha hecho posible la comercialización de productos fitofarmacéuticos estandarizados y de eficacia comprobada. Además, todavía no se han publicado prohibiciones de sus usos ni se ha demostrado que producen residuos peligrosos. Los estudios propuestos en este trabajo, eventualmente podrían contribuir al desarrollo de fitofármacos para el tratamiento preventivo de las úlceras gástricas, comunes en animales productores de carne en condiciones intensivas, como por ejemplo, los cerdos.

Finalmente puede agregarse que estos estudios contribuirán al conocimiento sobre las propiedades medicinales de las plantas que se desarrollan en la Provincia de la Pampa.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año 2017

Objetivos	Acciones	Metodología que se utilizará	Cronograma de realización														
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D			
Se ensayarán extractos de <i>Equisetum giganteum</i>	Desarrollo de bioensayos	Se inducirá úlceras por estrés, por agentes químicos y farmacológicos	+	+	+	+											
	Desarrollo de exámenes complementarios	Estudios de toxicidad. Determinación de pH de los extractos			+	+	+	+									
	Desarrollo de exámenes complementarios. Publicaciones	Evaluación de efecto sobre motilidad gástrica,					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Año 2018

Objetivos	Acciones	Metodología que se utilizará	Cronograma de realización														
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D			
Se ensayarán extractos de <i>Cortaderia selloana</i>	Desarrollo de bioensayos	Se inducirá úlceras por estrés, por agentes químicos y farmacológicos	+	+	+	+											
	Desarrollo de exámenes complementarios	Estudios de toxicidad. Determinación de pH de los extractos			+	+	+	+									
	Desarrollo de exámenes complementarios. Publicaciones	Evaluación de efecto sobre motilidad gástrica,					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Año 2019

<u>Objetivos</u>	<u>Acciones</u>	<u>Metodología que se utilizará</u>	<u>Cronograma de realización</u>													
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D		
Se ensayarán extractos de <i>Anthemis cotula</i>	Desarrollo de bioensayos	Se inducirá úlceras por estrés, por agentes químicos y farmacológicos	+	+	+	+										
	Desarrollo de exámenes complementarios	Estudios de toxicidad. Determinación de pH de los extractos			+	+	+	+								
	Desarrollo de exámenes complementarios. Publicaciones	Evaluación de efecto sobre motilidad gástrica,					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Año 2020

<u>Objetivos</u>	<u>Acciones</u>	<u>Metodología que se utilizará</u>	<u>Cronograma de realización</u>													
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D		
Se ensayarán extractos de <i>Atriplex undulata</i>	Desarrollo de bioensayos	Se inducirá úlceras por estrés, por agentes químicos y farmacológicos	+	+	+	+										
	Desarrollo de exámenes complementarios	Estudios de toxicidad. Determinación de pH de los extractos			+	+	+	+								
	Desarrollo de exámenes complementarios. Publicaciones	Evaluación de efecto sobre motilidad gástrica,					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:**

El Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la FCV, UNLPam (CIDEF) dispone en su Banco de Extractos Vegetales de las muestras necesarias para desarrollar los estudios propuestos.

El CIDEF posee todos los equipamientos y comodidades necesarias para el desarrollo del proyecto.

El Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam proveerá los ratones para los bioensayos.

Los bioensayos serán llevados a cabo en los Laboratorios del CIDEF y en la Sala de Administración y Ensayos de Drogas del Bioterio. Las necropsias y análisis de resultados se llevarán a cabo en la Sala de Necropsias del Bioterio.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

No son necesarios.

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

No se requieren equipamientos ni instalaciones fuera del ámbito de la Facultad.

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual) *

Año 2017

Drogas e insumos	\$ 4.500
Animales de experimentación	\$ 3.500
Inscripción a Jornadas y Congresos	\$ 2.500
Gastos imprevistos	\$ 2.500
TOTAL	\$ 13.000

Año 2018

Drogas e insumos	\$ 4.500
Animales de experimentación	\$ 3.500
Inscripción a Jornadas y Congresos	\$ 2.500
Gastos imprevistos	\$ 2.500
TOTAL	\$ 13.000

Año 2019

Drogas e insumos	\$ 4.500
Animales de experimentación	\$ 3.500
Inscripción a Jornadas y Congresos	\$ 2.500
Gastos imprevistos	\$ 2.500
TOTAL	\$ 13.000

Año 2020

Drogas e insumos	\$ 4.500
Animales de experimentación	\$ 3.500
Inscripción a Jornadas y Congresos	\$ 2.500
Gastos imprevistos	\$ 2.500
TOTAL	\$ 13.000

Presupuesto Total Años 2017 - 2020

Drogas e insumos	\$ 18.000
Animales de experimentación	\$ 14.000
Inscripción a Jornadas y Congresos	\$ 10.000
Gastos imprevistos	\$ 10.000
TOTAL	\$ 52.000

* *El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.*

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaraz, M. J.; Hoult, J. R. (1985). Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochem Pharmacol.* 34: 2477-2482.
- Brunton, L. L. (1996). Fármacos para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de úlceras pépticas. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9° edición* (J. G. Hardman, L. E. Limbird y A. Goodman Gilman, eds.). Ed. Interamericana McGraw-Hill, México D. F., México, pp. 965-980.
- Cavallini, M. E.; Andreollo, N. A.; Metze, K.; Araújo, M. R. (2006). Omeprazole and misoprostol for preventing gastric mucosa effects caused by indomethacin and celecoxib in rats. *Acta Cir Bras.* 21: 168-76.
- Cola Miranda, M.; Barbastefano, V.; Hiruma-Lima, C.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Monteiro Souza Brito, A. R. (2006). Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis*. *Kunth Biota Neotropica.* 6: 12-15.
- Cox, P.; Balick, M. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American.* 271: 82-87.
- Di Carlo, G.; Autore, G.; Izzo, A. A.; Maiolino, P.; Mascolo, N.; Viola, P.; Diurno, M. V.; Capasso, F. (1993). Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 1054-1059.
- Filinger, E. (2000). Fármacos usados para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de la úlcera gástrica. *Acta Farm. Bon.* 19: 133-142.

- Giordano, O. S.; Guerreiro, E.; Guzman, J. A.; Penissi, A. B.; Piezzi, R. S. (1997). Citoprotectores gastrointestinales obtenidos a partir de especies vegetales. *Pren. Méd. Argent.* 84: 890-899.
- Gorriti Gutiérrez, A.; Zárate Otarola, R.; Jurado Texeira, B. (1998). Bioensayos en especies de bodens con actividad terapéutica. *Cienc Invest.* 1: 23-26.
- Güntner, C.; Barra, C.; Cesio, V.; Dellacassa, E.; Ferrando, L. (1999). Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. *Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology, WOCMAP-2:* 159 - 162.
- Hammad, H. H.; Abdalla, S. S. (1997). Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen. Pharmac.*, 28: 767-771.
- Hernández, C. A.; Gollón, M. V. (2002). Helicobácteres gástritos de perros y gatos: mínimo riesgo en salud pública. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 17: 267-273.
- Hiruma Lima, C. A.; Gracioso, J. S.; Bighetti, E. J.; Grassi Kassisse, D. M.; Nunes, D. S.; Brito, A. R. (2002). Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. *Phytomedicine.* 9: 523-529.
- Jacobson, E. D. (1992). Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterology.* 102: 1788-1800.
- Khafagi, I.; Dewedar, A. (2000). The efficiency of random versus ethnodirected research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. *J. Ethnopharmacol.* 71: 365-376.
- Lee, Y.H.; Mollison, K. W.; Cheng, W. D. (1971). The effects of antiulcer agents on indomethacin-induced gastric ulceration in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 191: 371-7.
- Lin, W. C.; Tan, T. W. (1994). The rol of gastric muscle relaxation in cytoprotection induced by San-huang-xie-xin-tang en rats. *J. Ethnopharmacol.* 44: 171-179.
- Martín, M. J.; La Casa, C.; Alarcón de la Lastra, C.; Cabeza, J.; Villegas, I.; Motilva, V. (1998). Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Z. Naturforsch.* 53: 82-88.
- Murakami, M.; Lam, S. K.; Inada, M. (1985). Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint stress in rats. *Gastroenterology.* 88: 660 - 665.
- Robert, A.; Nezamis, J.; Lancaster, C.; Hanchar, A. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology.* 77: 433-43.
- Sandoval, M.; Ayala, S.; Ore, R.; Loli, A.; Huamán, O.; Valdivieso, R.; Béjar, E. (2006). Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*) sobre la mucosa gástrica, en animales de experimentación. *An. Fac. med.* 67: 199-205.

Toso, R. E. ; Boeris, M. A. (2005^a). Evaluación del efecto antiulceroso de *Acmella decumbens* y *Gnaphalium gaudichaudianum*. Memorias de la IV Jornada de Ciencia y Técnica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. pag 9.

Toso, R. E. ; Boeris, M. A. (2005^b). Evaluación del efecto antiinflamatorio y protector gástrico de *Jodina rhombifolia*. Memorias de la IV Jornada de Ciencia y Técnica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. pag 7.

Toso, R. E.; Steibel, P. E.; Troiani, H. O.; Oriani, D. S.; Ardoino, S.; Toribio, M.; Boeris, M. (2006). Búsqueda sistematizada de plantas con actividad farmacológica utilizando el Banco de Extractos Vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa. Vol 8. Versión electrónica: <http://www.vet.unlpam.edu.ar/~matervet/revistanro8/indice.htm>.

Toso, R. E.; Skliar, M. I.; Verna, E. (2002). Modelo experimental para evaluar el tránsito gastrointestinal en ratones. *Ciencia Veterinaria*. 4: 44 – 48.

Toso, R. E.; Toribio, M. S.; Mengelle, P.; Boeris, P. (2007) Plantas de la Provincia de La Pampa, Argentina, con actividad gastroprotectora y antiespasmódica. *InVet*. Vol 9. Versión electrónica: <http://www.fvet.uba.ar/invet/lapampa.pdf>.

Yesilada, E.; Gurbuz, I.; Shibata, H. (1999). Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Ethnopharmacol.*, 3: 289 - 293.