



Efecto prosexual de una planta autóctona usada en la etnomedicina

Farm. Marcela Alejandra Birri

Trabajo de tesis para optar al grado de
Doctora en Ciencias Químicas

Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Comisión de tesis

Directora: Prof. Dra. Alicia Mariel Agnese

Codirectora: Prof. Dra. Ana Carolina Donadio

Prof. Dra. Mariela Fernanda Pérez

Prof. Dra. María Gabriela Ortega

Evaluador externo: Dr. Pascual Gargiulo

A mis padres, Josefina y Enrique
A Juan Fernando, mi hijo

Agradecimientos de esta tesis . . .

Al Dr. Pascual Gargiulo, por aceptar evaluar mi tesis.

A los miembros de mi comisión de tesis por guiarme durante todos estos años y por todos sus valiosos aportes.

A mi codirectora, Dra. Ana Carolina Donadio, gracias por enseñarme y guiarme, principalmente en mis comienzos. Permitiéndome entrar en un mundo nuevo para mí, pero muy fascinante, el de las células. Gracias a vos y a todo el 216 por ayudarme siempre que lo necesité.

A mi directora, Dra. Mariel Agnese. Mariel, gracias por confiar en mí, por apoyarme, por entenderme y ayudarme en todo momento. Gracias por estar a mi lado en esos momentos en que la vida te pone a prueba. Gracias por ser como mi segunda mamá.

Al Dr. Miguel Carro Juárez, por abrirme las puertas de su laboratorio, por estar dispuesto a enseñarme y ayudarme en todo momento. A todos los chicos del laboratorio de comportamiento reproductivo de Tlaxcala, mil gracias por todo lo que hicieron por mí.

Al Dpto. de Bioquímica Clínica por permitirme trabajar allí y al Departamento de Química Biológica, por prestarme su bioterio e instalaciones. Ambos departamentos posibilitaron la concreción de una buena parte de esta tesis.

A CONICET por la beca otorgada para el desarrollo de esta tesis y por los subsidios, al igual que SECYT, Agencia Córdoba Ciencia y FONCYT.

A las personas que más me bancaron en estos años dentro de la facu, mis compañeros de farmacognosia...

Dr Cabrera, Susi y Gabi, gracias por transmitirme sus conocimientos y ofrecerme su ayuda cuando lo necesité.

A las chicas del 206, Jesi, Pame, Laurita, Juli, Dani y Laura, gracias por estar, por los mates y charlas compartidas. Por sus palabras y ayuda.

Al 208, las que realmente me tuvieron que aguantar siempre... A Marival, por ayudarme, por enseñarme, por explicarme, por tu paciencia, pero por sobre todo gracias por estar a mi lado, por escucharme, acompañarme, por ser una gran amiga.

Mari P, gracias por regalarme tu amistad, tus palabras, por estar siempre ahí, por tu ayuda.

Mica, sos una persona muy especial, siempre dispuesta a hacerme un favor cuando lo necesite, siempre con las palabras justas para simplificar las cosas, gracias por tu amistad.

Sofí, gracias por ayudarme, por tenerme paciencia ante todas mis ausencias y por tu gran ayuda en estos años.

Mati, mi col, gracias por todo lo que hiciste por mí, sobre todo cuando comenzamos. Por ayudarme y acompañarme siempre. Por darme una mano desinteresada en todo momento, pero más que nada, gracias por brindarme tu amistad, sos un amigo de oro.

A mi grupo “juntada 2020”... gracias por los momentos compartidos, por las charlas, por su cariño y amistad.

A las distintas personas que pasaron por el labo y me ayudaron de una u otra manera, Cari, Andre, Luciano, Mariam y tantos otros que seguro olvido.

A la gente del departamento de Farmacia.

A mi amiga de la vida, Yani, que me acompañó en todo momento.

A mis amigas de la facu, Vane, Ivi, Gise, Nati, Juli y Gabi, por estar siempre, aún a la distancia.

A mi gran amiga, Aida, por tus consejos y palabras, por estar ahí.

A toda mi familia, pero especialmente a...

Mi mami y mi papi, por apoyarme siempre para que logre cumplir mis sueños, por enseñarme a luchar por lo que uno quiere. Por estar a mi lado, por amarme tanto. Papi gracias porque sé que iluminas mi camino desde donde estés.

A mi hermana, por ser siempre una gran amiga que me acompaña y ayuda en todo, me sostiene y levanta cuando las cosas cuestan más. Te quiero mucho. A su esposo por acompañarme y ayudarme.

A Dani, mi esposo, mi compañero. Por su paciencia y apoyo, por acompañarme y respetar esto que tanto me apasiona pero que restó mucho de nuestro tiempo. Por amarme tanto y perdonar mis locuras. Por darme el mejor regalo, nuestro hermoso hijo. Te amo!

A mi pequeño gigante, Juan Fernando, por todos los momentos que estuve ausente, por estar a mi lado siempre, por estudiar conmigo, por llenarme de besos. Por ser el motor que me impulsa a seguir. Te amo con toda mi alma hijito!!

A todos los que me ayudaron, pero sobretodo a Dios y a la Virgen del Milagro que me iluminaron siempre.

A todos gracias!!!

Marce

Índice



Índice

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	11
SUMMARY	13
CAPITULO 1: Introducción y objetivos	17
1.1. Introducción	19
1.2. Bibliografía	26
CAPITULO 2: Estudio Epidemiológico	29
2.1. Introducción	31
2.2. Material y métodos	31
2.2.1. Estudio epidemiológico.....	31
2.2.2. Población, Lugar y tiempo.....	32
2.2.3. Instrumento.....	32
2.2.4. Ética.....	32
2.2.5. Análisis estadístico.....	33
2.3. Resultados	33
2.4. Conclusiones	35
2.5. Bibliografía	36
CAPITULO 3: La Química de <i>Phlegmariurus saururus</i>	37
3.1. Introducción	39
3.2. Material y métodos	39
3.2.1. Obtención e Identificación botánica del material vegetal.....	39
3.2.2. Procesamiento del Material vegetal.....	40
3.2.3. Obtención de los extractos.....	40
3.2.3.1. Decocción.....	40
3.2.3.2. Extracto etanólico.....	40
3.2.3.3. Extracto alcaloidal.....	41
3.2.4. Marcha Fitoquímica.....	42

3.2.5. Extracción y Purificación de los alcaloides	45
3.2.6. Validación de la metodología de extracción e identificación	47
3.3. Resultados	48
3.3.1. Preparación de los extractos	48
3.3.2. Marcha Fitoquímica.....	49
3.3.3. Extracción y Purificación de los alcaloides	50
3.3.4. Validación.....	51
3.4. Conclusiones	52
3.5. Bibliografía	53
CAPITULO 4: Eyaculación Ficticia	55
4.1. Introducción	57
4.2. Material y métodos	58
4.2.1. Animales	58
4.2.2. Preparación de los animales a ser experimentados en el modelo de eyaculación ficticia.....	59
4.2.3. Activación de la respuesta de la eyaculación ficticia	60
4.2.4. Análisis de los datos	61
4.3. Experimentación	62
4.3.A. Experimento 1: Efecto producido por la decocción de <i>P. saururus</i>	62
4.3.B. Experimento 2: Efecto producido por el Extracto alcaloidal de <i>P. saururus</i>	64
4.3.C. Experimento 3: Efecto producido por los alcaloides aislados de <i>P. saururus</i>	68
4.3.C.I. Experimento desarrollado con el alcaloide aislado, sauroína.....	68
4.3.C.II. Experimento desarrollado con el alcaloide aislado, sauroxina....	70
4.4. Conclusiones	73
4.5. Bibliografía	74
CAPITULO 5: Conducta sexual	77
5.1. Introducción	79
5.2. Material y métodos	80
5.2.1. Protocolo de pruebas de comportamiento sexual.....	80
5.2.2. Entrenamiento.....	81

5.2.3. Animales	81
5.2.4. Análisis de los datos	82
5.3. Experimentación.....	83
5.3.1. Experimento 1: Efecto de la decocción de <i>P. saururus</i> sobre la conducta sexual de las ratas macho, sexualmente expertas	83
5.3.2. Experimento 2: Efecto de la decocción de <i>P. saururus</i> sobre la conducta sexual de las ratas macho no copuladoras	86
5.3.3. Experimento 3: Efecto de la decocción de <i>P. saururus</i> sobre la conducta sexual de las ratas macho adultas mayores	93
5.3.4. Experimento 4: Efecto del extracto etanólico de <i>P. saururus</i> sobre la conducta sexual de las ratas macho	95
5.3.5. Experimento 5: Efecto del extracto alcaloidal de <i>P. saururus</i> sobre la conducta sexual de las ratas macho	97
5.3.6. Experimento 6: Efecto de Sauroxina sobre la conducta sexual de las ratas macho, sexualmente expertas.....	100
5.3.7. Experimento 7: Efecto de los alcaloides de <i>Phlegmariurus saururus</i> sobre la conducta sexual de las ratas macho no copuladoras	103
5.4. Conclusiones	105
5.5. Bibliografía	106
CAPITULO 6: Mecanismos de acción	109
6.1. Introducción	111
6.2. Experimentación.....	112
6.2.1. Experimento 1: Expresión de la enzima eNOS	112
6.2.2. Experimento 2: Concentración de NO en el plasma de ratas macho adultas.....	119
6.2.3. Experimento 3: En el modelo de eyaculación ficticia, ¿Por cuál mecanismo actúa la decocción de <i>P. saururus</i> ?	122
6.3. Conclusiones	125
6.4. Bibliografía	126
CAPITULO 7: Toxicidad de <i>Phlegmariurus saururus</i>.....	129
7.1. Introducción.....	131
7.2. Material y métodos	131

7.2.1. Observaciones realizadas	133
7.2.2. Pruebas hematológicas	133
7.2.3. Pruebas relacionadas a la función renal, hepática y otras específicas ...	134
7.2.4. Análisis histopatológicos.....	135
7.2.5. Análisis de los datos.....	135
7.3. Resultados	138
7.4. Conclusiones	140
7.5. Bibliografía	141
CONCLUSIONES	143
PROYECCIONES	151
PRODUCCION CIENTIFICA	155

Abreviaturas



<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
<i>5-HT</i>	Serotonina
<i>a.C.</i>	antes de Cristo
<i>ACh</i>	Acetilcolina
<i>AchE</i>	Acetilcolinesterasa
<i>ADEu-CV%</i>	Porcentaje de amplitud de distribución de eritrocitos
<i>ALT</i>	Alanina amino transferasa
<i>ANMAT</i>	Agencia Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
<i>ANOVA</i>	Análisis de varianza
<i>AST</i>	Amino aspartato tranferasa
<i>B.</i>	Benjamin
<i>BaCl₂</i>	Cloruro de Bario
<i>BaSO₄</i>	Sulfato de Bario
<i>Ca⁺⁺</i>	Catión Calcio
<i>CC</i>	Cromatografía en columna
<i>CCD</i>	Cromatografía en capa delgada
<i>cel</i>	Células
<i>CGL-EM</i>	Cromatografía gas-líquido-espectrometría de masas
<i>CGR</i>	Conteo de eritrocitos
<i>CHCl₃</i>	Cloroformo
<i>CHCM</i>	Concentración de hemoglobina corpuscular media
<i>CIBICI</i>	Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
<i>cm</i>	Centímetros
<i>CNC</i>	Control No copulador
<i>CO₂</i>	Dióxido de carbono
<i>Col.</i>	Colaboradores
<i>CONICET</i>	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
<i>CORD</i>	Herbario del Museo Botánico de Córdoba
<i>CSE</i>	Control sexualmente expertos
<i>DER</i>	Relación Extracto Droga
<i>DF</i>	Droga fraccionada

<i>DG</i>	Droga a granel
<i>DI</i>	Diámetro interno
<i>EA</i>	Extracto acuoso
<i>EC</i>	Extracto clorofórmico
<i>EE.UU.</i>	Estados Unidos
<i>EMA</i>	Agencia Europea de Medicamentos
<i>emeA</i>	Agencia Europea de Medicamentos
<i>EMG</i>	Actividad electromiográfica
<i>eNOS</i>	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
<i>EtOH</i>	Etanol
<i>eV</i>	Electronvoltio
<i>FAL</i>	Fosfatasa alcalina
<i>FD</i>	Frecuencia de descargas
<i>FE</i>	Fase estacionaria
<i>FeCl₃</i>	Cloruro férrico
<i>Fig.</i>	Figura
<i>FM</i>	Fase móvil
<i>GABA</i>	Ácido gamma-aminobutírico
<i>GCPE</i>	Generador central de patrones espinales
<i>GMPc</i>	Guanosín monofosfato cíclico
<i>g</i>	Gramos
<i>GTP</i>	Guanosín trifosfato
<i>h</i>	Horas
<i>H₂</i>	Hidrógeno
<i>HCM</i>	Hemoglobina corpuscular media
<i>H₂SO₄</i>	Ácido sulfúrico
<i>HCl</i>	Ácido clorhídrico
<i>HCl (c)</i>	Ácido clorhídrico concentrado
<i>HGB</i>	Concentración de hemoglobina
<i>HTC</i>	Hematocrito
<i>IC</i>	Intervalo de confianza
<i>i.m.</i>	Intramuscular
<i>IMBIV</i>	Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal

<i>iNOS</i>	Enzima óxido nítrico sintasa inducida
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
<i>IPE</i>	Intervalo post eyaculatorio
<i>kDa</i>	Kilodalton
<i>kg</i>	Kilogramo
<i>kHz</i>	Kilohertz
<i>Lam.</i>	Jean-Baptiste de Lamarck
<i>L</i>	Linfocitos
<i>LD</i>	Latencia de descarga
<i>LE</i>	Latencia de eyaculación
<i>LI</i>	Latencia de intromisión
<i>LM</i>	Latencia de monta
<i>LO</i>	Luz/oscuridad
<i>M</i>	Molar
<i>m.s.n.m.</i>	Metros sobre el nivel del mar
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>Mg</i>	Magnesio
<i>MgCl₂</i>	Cloruro de magnesio
<i>min</i>	Minutos
<i>mL</i>	Mililitros
<i>mm</i>	Milímetros
<i>mM</i>	Milimolar
<i>Mo</i>	Monocitos
<i>MPV</i>	Volumen plaquetario medio
<i>ms</i>	Milisegundos
<i>MTT</i>	Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
<i>N</i>	Normal
<i>n</i>	Tamaño muestral
<i>NaOH</i>	Hidróxido de sodio
<i>NC</i>	Número de cuadrados que el animal cruzó en el campo abierto
<i>ND</i>	Número de descargas
<i>NEBA</i>	Número de entradas en los brazos abiertos
<i>NEBC</i>	Número de entradas en los brazos cerrados

<i>NET</i>	Número de entradas totales
<i>NH₄OH</i>	Hidróxido de amonio
<i>NI</i>	Número de intromisiones
<i>NM</i>	Número de montas
<i>nNOS</i>	Enzima óxido nítrico sintasa neuronal
<i>NO</i>	Óxido nítrico
<i>NPM</i>	Número de patrones motores
<i>NS</i>	Neutrófilos segmentados
<i>°C</i>	Grados centígrados
<i>Øllg.</i>	Øllgaard
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>OT</i>	Oxitocina
<i>PA</i>	Principios activos
<i>PCT%</i>	Porcentaje de procalcitonina
<i>PDE5</i>	Fosfodiesterasa 5
<i>PDW</i>	Distribución de volumen
<i>PKA</i>	Proteína quinasa A
<i>PKG</i>	Proteína quinasa G
<i>P-LCR</i>	Tamaño promedio de plaquetas
<i>PLT</i>	Conteo de plaquetas
<i>% NEBA/NET</i>	proporción entre el número de entradas de brazos abiertos y el número de entradas totales
<i>PPE</i>	Periodo post eyaculatorio
<i>Psi</i>	Libras por pulgada cuadrada, unidad de presión
<i>r²</i>	Coefficiente de determinación
<i>RGB</i>	Recuento de glóbulos blancos
<i>RIPA</i>	Buffer de lisis
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>RPMI</i>	Roswell Park Memorial Institute
<i>Rvo.</i>	Reactivo
<i>s</i>	Segundos
<i>SBF</i>	Suero Bovino Fetal
<i>SDS</i>	Dodecilsulfato sódico

<i>SDS-PAGE</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
<i>SEM</i>	Error estándar de la media
<i>SG</i>	Solución para administración en forma de gotas
<i>SNC</i>	Sistema Nervioso Central
<i>T6</i>	Vertebra torácica (6) de la médula espinal
<i>TA</i>	Tiempo de aseo
<i>TBA</i>	Tiempo en brazos abiertos del laberinto
<i>TBC</i>	Tiempo en brazos cerrados del laberinto
<i>TBS</i>	Tampón fosfato salino
<i>TBST</i>	TBS-Tween 20
<i>TCV</i>	Tiempo de conducta vertical
<i>Tr</i>	Tiempo de retención
<i>UV</i>	Ultravioleta
<i>V</i>	Voltios
<i>VCM</i>	Volumen corpuscular medio
<i>ZnSO₄</i>	Sulfato de Zinc
<i>μg</i>	Microgramos
<i>μL</i>	Microlitros
<i>μmol</i>	Micromoles

Resumen



Efecto prosexual de una planta autóctona usada en la etnomedicina

Phlegmariurus saururus (Lam.) B. Øllg., tradicionalmente conocida como "cola de quirquincho", es una especie autóctona de Argentina que de acuerdo a los relatos de la etnomedicina, es consumida por sus propiedades como afrodisíaca. Sin embargo, hasta el presente no existían estudios que avalaran este uso popular. Consecuentemente, fue objetivo de esta tesis, determinar si existe un correlato científico para el uso que tradicionalmente se le asigna a *P. saururus*.

Se estableció mediante un estudio epidemiológico de Corte, que el 67 % de las personas que compraban *P. saururus*, lo hacían para consumirla como afrodisíaca y que se expendía en el 50 % de los establecimientos relevados en el centro de la ciudad de Córdoba (farmacias, herboristerías y dietéticas), en el año 2013.

Así, se comenzó estudiando el efecto afrodisíaco de la decocción, por ser ésta la principal forma de consumo, continuando con los principales extractos (alcohólico y alcaloidal), para finalmente estudiar el efecto de los alcaloides mayoritarios aislados, sauroína y sauroxina.

Utilizando el modelo animal de eyaculación ficticia se demostró que la decocción de *P. saururus* produce facilitación del umbral eyaculatorio y reduce la inhibición que bloquea (desde la médula espinal) la eyaculación, promoviéndola. Al mismo tiempo aumenta la potencia eyaculatoria, produciendo un mayor número de contracciones en los músculos genitales. Finalmente, mejora la capacidad eyaculatoria, provocando un mayor número de eyaculaciones y disminuye el período refractario. Estos efectos son producidos, al menos parcialmente, por sauroxina y sauroína.

En ensayos de conducta sexual se observó que *P. saururus* tiene efecto prosexual. En animales jóvenes sexualmente expertos produjo una disminución en el tiempo que tardan en eyacular. Asimismo, la decocción posibilitó que animales no copuladores se comporten como copuladores, revirtiendo su condición aún, a los 15 días de haber consumido la decocción. Igualmente, en animales copuladores adultos mayores, bajo administración a dosis repetidas, se observó una disminución en la latencia eyaculatoria en el quinto día de tratamiento. El efecto en animales copuladores sería producido, al menos parcialmente, por sauroxina, mientras que el efecto en no copuladores, sólo se evidenció con la decocción.

En distintos ensayos tendientes a dilucidar cuál sería el mecanismo por el cual *P. saururus* ejerce su efecto, se comprobó que lo hace principalmente por la vía nitrérgica (aumenta la expresión de eNOS, incrementa los niveles plasmáticos de óxido nítrico en animales luego de copular y el efecto es bloqueado en parte, cuando animales espinalizados reciben un antagonista nitrérgico). Asimismo fue demostrado que también actúa, al menos regulando la eyaculación, a nivel espinal haciendo blanco en las vías oxitocinérgica, colinérgica, adrenérgica y serotoninérgica.

Para poder evaluar cuán seguro es el consumo de *P. saururus*, se realizaron ensayos de toxicidad aguda. Los resultados permiten afirmar que la decocción administrada a una única dosis de 2000 mg/kg no generó mortalidad, aunque sí produjo en las ratas Wistar signos de toxicidad que remitieron completamente pasadas 6 h del tratamiento. Digno de señalar resulta que el rango terapéutico es 67 veces menor que la concentración a la que se observaron los signos tóxicos.

Como corolario de esta tesis se puede concluir que existe un correlato científico para el uso que la etnomedicina le atribuye a *P. saururus* y que parte de este efecto es producido por sus alcaloides.

Summary



Pro-sexual effect of an autochthonous plant used in the ethnomedicine

Phlegmarirurus saururus (Lam.) B. Øllg., traditionally known as "armadillo tail", is an autochthonous species in Argentina that, according to ethnomedicine accounts, is consumed by its properties as an aphrodisiac. However, to date there were no studies to support this popular use. Consequently, it was the objective of this thesis, to determine if there is a scientific correlate for the use traditionally assigned to *P. saururus*.

It was established by an epidemiological Cross-sectional Study, that 67% of the people who bought *P. saururus* did so to consume it as an aphrodisiac and that it was sold in 50% of the establishments surveyed in the city center of Córdoba (pharmacies, herbalists and dietary), in the year 2013.

Thus, the aphrodisiac effect of the decoction was studied, since this is the main form of consumption, continuing with the main extracts (ethanol and alkaloid), to finally study the effect of the isolated major alkaloids, sauroin and sauroxin.

Using the fictitious ejaculation model, it was demonstrated that the decoction of *P. saururus* produces facilitation of the ejaculatory threshold and reduces the inhibition that blocks (from the spinal cord) the ejaculation, promoting it. At the same time ejaculatory potency increases, producing a greater number of contractions in the genital muscles. Finally, it improves the ejaculatory capacity, causing a greater number of ejaculations and decreases the refractory period. These effects are produced, at least partially, by sauroxin and sauroin.

In sexual behavior tests it was observed that *P. saururus* has a pro-sexual effect. In sexually experienced young animals produced a decrease in the time they take to ejaculate. Likewise, the decoction turned non-copulating animals into copulators, reverting their condition even, 15 days after having consumed the decoction. Similarly, in elderly copulator animals, under repeated dose administration, a decrease in ejaculatory latency was observed on the fifth day of treatment. The effect on copulator animals would be produced, at least partially, by sauroxin, whereas the effect on non-couplers was only evidenced with the decoction.

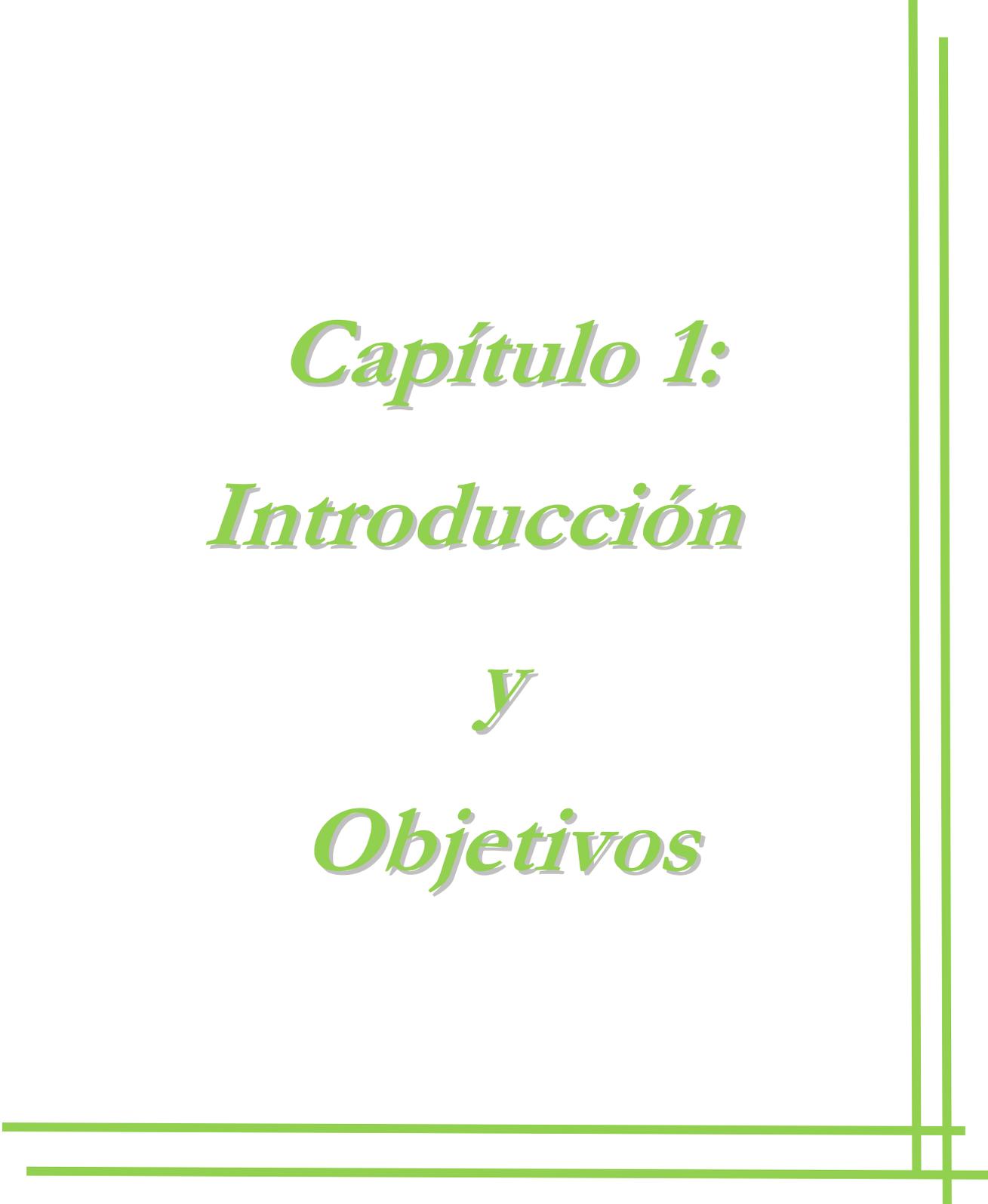
In several experiments aimed at elucidating the mechanism by which *P. saururus* exerts its effect, it was found to be mainly by the nitrergic route (increases the expression of eNOS, increases plasma levels of nitric oxide in animals after copulation and the effect

is blocked in part, when spinalized animals receive a nitergic antagonist). It was also demonstrated that it also acts, at least regulating ejaculation, at the spinal level targeting the oxytocinergic, cholinergic, adrenergic and serotonergic pathways.

In order to evaluate how safe the consumption of *P. saururus* is, acute toxicity tests were performed. The results allow to affirm that the decoction administered at a single dose of 2000 mg/kg did not generate mortality, although it did in the Wistar rats show signs of toxicity that were completely remitted after 6 h of the treatment. It is worth noting that the therapeutic range is 67 times lower than the concentration at which the toxic signs were observed.

As a corollary of this thesis one can conclude that there is a scientific correlation for the use that the ethnomedicine attributes to *P. saururus* and that part of this effect is produced by its alkaloids.

Capítulo 1:
Introducción
y
Objetivos



1.1. Introducción

¿Cuál es la importancia del estudio de las plantas?

Todas las sociedades a lo largo de la historia han recurrido al uso de diversas plantas para tratar problemas de salud, es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido el estudio de las plantas como fuentes de medicamentos. Durante la Conferencia de Alma-Ata, celebrada en 1978, se acordó impulsar la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional y la moderna, sobre la base de que las prácticas peligrosas se eliminarían y sólo se promovería lo que fuese seguro y eficaz (Akerele, 1993).

Al mismo tiempo, a través de la etnofarmacología, se busca rescatar y documentar el patrimonio cultural, investigando y evaluando los agentes comúnmente empleados. Como meta final se busca validar las preparaciones tradicionales, ya sea a través del aislamiento de sustancias activas, o a través de diversos hallazgos farmacológicos (Mukherjee y col., 2010).

La OMS definió a las plantas medicinales como “cualquier especie vegetal que contenga sustancias que puedan ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos puedan servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos” (OMS, 1979).

La prevalencia mundial de uso de plantas medicinales ronda el 80 %, según afirma la OMS (OMS, 1993). Al estudiar nuestro panorama local, se encontró que en la ciudad de Córdoba, el 81,90 % de las personas recurre a las plantas medicinales para tratar algún problema de salud (Birri y col., 2013), en concordancia con lo especificado por la OMS.

Teniendo en cuenta los estudios etnofarmacológicos, las recomendaciones de la OMS y el alto grado de consumo de plantas medicinales, resultan muy valiosas las investigaciones sobre las especies más utilizadas en nuestro país, especialmente las que tienen pocos o nulos estudios científicos.

Es así que una de las especies cuya investigación en relación a su principal uso en la medicina tradicional resultaría de real interés es *Phlegmariurus saururus* (Lam.) B. Øllg., y de ella nos ocuparemos en adelante.

¿Qué sabemos sobre *Phlegmariurus saururus*?

Se trata de una especie perteneciente a la familia Lycopodiaceae P. Beauv. ex Mirb., un grupo de plantas vasculares con una larga historia evolutiva (Øllgaard, 2012). Su ubicación sistemática fue muy controvertida y sufrió, a lo largo de la historia, sucesivas denominaciones a medida que era estudiada por los especialistas. Así, en 1789 fue denominada *Lycopodium saururus* Lam., posteriormente en 1875 fue *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis, hasta que en 2012 Øllgaard, la incorporó al género *Phlegmariurus* donde actualmente se encuentra (Arana y Øllgaard, 2012), aunque también fue mencionada en algún momento como *Urostachys saururus* (Lam.) Herter.

Tradicionalmente fue y es conocida en la medicina popular, como "cola de quirquincho" (Hieronymus, 1882; Amorín, 1974; de la Sota, 1977; Ratera y Ratera, 1980).

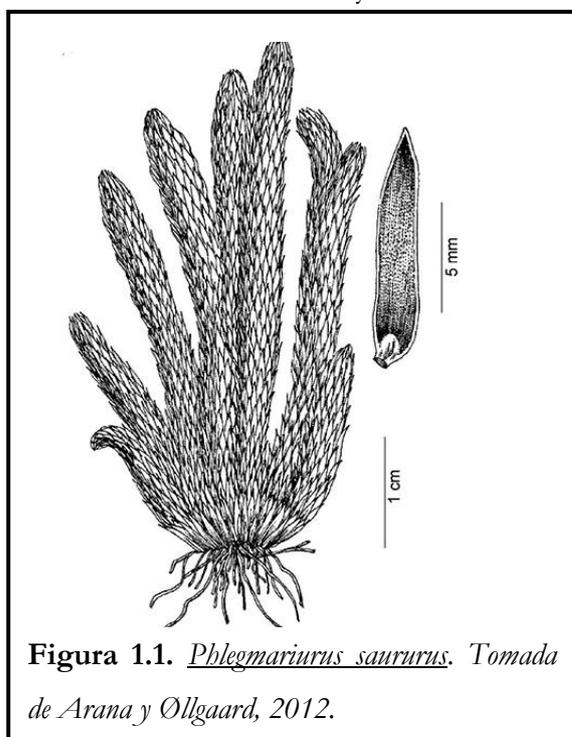


Figura 1.1. *Phlegmariurus saururus*. Tomada de Arana y Øllgaard, 2012.

P. saururus es una planta mediana, con rizomas muy cortos de donde surgen las raíces. Los tallos son cilíndricos, erectos, simples o dicotómicamente ramificados, de hasta 50 cm de altura. Las hojas, por su parte, son lineales, uninervias, sésiles, verdes hasta amarillentas, brillantes, carnosas, convexas en el haz, planas en el envés, de borde entero a rugoso. Esporangios globosos, amarillos o anaranjados,

cubiertos por los esporofilos (Arana y Øllgaard, 2012).

Dicha especie, tiene un hábitat terrestre o saxícola. Frecuentemente se la puede encontrar, en los pastizales de altura, a partir de los 1200 m.s.n.m., habitando grietas y fisuras en las rocas (Morero y col., 2014).

Esta especie netamente Gondwánica (Arana y col., 2011), se encuentra distribuida en el Atlántico sur en la isla Tristán de Acuña, en regiones montañosas de África tropical y del sur (Natal, El Cabo, Lesotho, Zimbabwe, Malawi, Uganda, Kenya, Tanzania, Etiopía, Camerún, Madagascar, Reunión y Mauricio) y en el neotrópico de América del Sur, en la

región andina desde Perú hasta Chile y Argentina. En nuestro país se encuentra en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Córdoba, San Luis y Buenos Aires, en donde las sierras de Tandilia y Ventania constituyen el límite austral de su distribución (Øllgaard, 1992).



Ya desde fines del siglo XIX en la etnomedicina se hacía referencia al consumo de *P. saururus*, principalmente por sus efectos afrodisíacos (Hieronymus, 1882) aunque también se mencionaba que poseía acción emética y catártica (Blondel, 1887).

En el siglo XX, además de continuar mencionándola como afrodisíaca (Toursarkissian, 1980), también se decía que se utilizaba para resolver el estado de ánimo y los trastornos sentimentales (Amorín, 1974). Hacia finales del siglo XX, fue reportada como un agente mejorador de

la memoria (Martínez Crovetto, 1981).

Los primeros estudios en cuanto a la composición química de la especie datan del siglo XIX, cuando Bardet caracterizó un alcaloide (pillijanina) al que le asignó la fórmula probable $C_{15}H_{24}N_2O$ (Arata y Canzoneri, 1892). Pillijanina nunca fue aislada *a posteriori*, seguramente porque sólo se trató de una mezcla de compuestos que no pudo resolverse, dada la tecnología disponible en esos años.

En el siglo XX, Deulofeu y col. (1942), continuaron el estudio de la especie y aislaron dos alcaloides, sauririna y sauroxina, siendo, recién en 1965 determinada la estructura de sauroxina por Ayer y col, y como en el caso de pillijanina, sauririna tampoco fue nunca más encontrada.

Posteriormente, distintos científicos continuaron estudiando el género *Lycopodium* dilucidando diferentes alcaloides, algunos de ellos presentes en esta especie (lycopodina, clavolonina, huperzina A), aunque algunos, mencionados hace muchos años, no lograron identificarse nuevamente en esta planta (anhidrolycodolina, dihidrolycopodina, acetilfawcettiina, fawcettiina), (Braekman y col., 1974; MacLean, 1985).

Ya en el siglo XXI, Ortega y col. (2004a) identificaron un nuevo alcaloide: sauroína. Luego, Vallejo y col. (2013a) reportaron otro alcaloide novedoso: *N*-demetilsauroxina y al mismo tiempo corroboraron la estructura de sauroxina mediante nuevas técnicas espectroscópicas. Nuestro grupo de trabajo hizo posible que en *P. saururus* se caracterizaran un total de trece alcaloides y se identificaran diez de ellos: huperzina A, lycodina, sauroxina, lycopodina, *N*-metillicodina, *N*-demetilsauroxina, 6-hidroxicopodina, clavolonina, sauroína y *N*-acetillicodina (Ortega y col., 2004b; Vallejo y col., 2013a).

De todos los usos que se le atribuyeron a lo largo de los años, sus posibles efectos sobre la memoria fueron los primeros que se estudiaron con detenimiento. Así, nuestro grupo de investigación publicó un buen número de trabajos en relación a este tema, comenzando por informar que el extracto alcaloidal inhibe la enzima acetilcolinesterasa (Ortega y col., 2004b), e incluso varios años después se determinó la forma en que algunos alcaloides se unen a esta enzima para ejercer su acción (Puiatti y col., 2013). Posteriormente se profundizaron los estudios relacionados con aprendizaje y memoria produciendo una serie de publicaciones (Ortega y col., 2006, Vallejo y col., 2007; Vallejo y col., 2009; Ortega y col., 2010; Vallejo y col., 2013a, b).

Los primeros estudios relacionados a la actividad afrodisíaca de la especie fueron realizados por Hnatyszyn y col. (2003). Ellos observaron, en ensayos *in vitro*, que extractos de *P. saururus* (*Huperzia saururus*, al momento del estudio), realizados en metanol y diclorometano, producían relajación de la musculatura de los cuerpos cavernosos del pene.

¿Qué son los afrodisíacos masculinos?

De acuerdo a Sandroni (2001), los afrodisíacos son sustancias capaces de excitar la libido o despertar el instinto sexual. Pueden ser clasificados según su modo de acción en tres tipos: los que aumentan la libido (es decir, la excitación sexual), la potencia (es decir, los reflejos sexuales) o el placer sexual.

La importancia de contar con sustancias afrodisíacas radica en la necesidad de disponer de fármacos capaces de mejorar los problemas de disfunción eréctil. La impotencia masculina o disfunción eréctil se define como la incapacidad del hombre de alcanzar y mantener una erección con suficiente rigidez como para lograr una penetración vaginal satisfactoria hasta el orgasmo y la eyaculación. Se estima que a nivel mundial, entre

el 30 y el 40 % de los hombres mayores de 40 años sufre de algún grado de disfunción eréctil (Köhler y McVary, 2016).

Remontándonos en la historia, las primeras descripciones de la disfunción eréctil se encontraron en un papiro Egipcio de aproximadamente 2000 años a.C., en donde se describieron dos tipos de disfunción, la impotencia natural en la cual el hombre era incapaz de culminar el acto sexual y la impotencia sobrenatural, como resultado del demonio y la brujería (Bolgeri y col., 2008). Posteriormente, aproximadamente 300 años a.C., Aristóteles afirmaba que los nervios del pene llevaban espíritu y energía para la erección y que ésta era debida a insuflación de aire. Fue recién en 1505 que se pudo comenzar a entender mejor lo que sucede durante la erección cuando Leonardo da Vinci, según data en las *'Notes and Drawings on Reproductions and on the Mechanisms of Intimate Human Functions'*, observó una gran cantidad de sangre en el pene erecto de un hombre ahorcado (para un trabajo más actualizado ver van Driel, 2015).

Dado que la erección es un fenómeno complejo en el que participan mecanismos neurovasculares, endócrinos y psicológicos, las causas que producen disfunción eréctil son variadas, y muchas veces se encuentran asociada a otras patologías (Köhler y McVary, 2016). Debido a la gran variedad de factores asociados a la misma, no todos los medicamentos que se utilizan actualmente son efectivos para todos los pacientes, además la gran mayoría de los fármacos utilizados producen diversos efectos secundarios.

¿Cuál es la fisiología del acto sexual en el hombre?

El acto sexual masculino, comienza con la estimulación, ya sea física o psíquica, que desencadena la erección. Ésta se produce debido a que aumenta la entrada de sangre al pene y disminuye la salida, lo que activa los tejidos esponjosos eréctiles de tal forma que éste se endurece y se agranda.

El principal mediador de la erección es el óxido nítrico (NO, por su sigla en inglés). Esta molécula endógena, se forma por la acción de la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) que convierte el aminoácido L-arginina en L-citrulina y NO (Figura 1.2.).

Se sabe que existen tres isoformas de dicha enzima, dos constitutivas: la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS) y una inducible (iNOS). En los nervios parasimpáticos que inervan el pene, existe la isoforma nNOS, mientras que en las células endoteliales se encuentra la eNOS.

El comienzo de la erección está liderado por los nervios cavernosos, quienes mediante determinados estímulos, liberan NO. Posteriormente, el roce del flujo sanguíneo en el tejido endotelial, activa la eNOS para continuar produciendo NO que actúa manteniendo la erección.

Todo el NO formado (neuronal y vascular) se difunde en las células del músculo liso y activa la Guanilato Ciclasa (GC), que favorece la conversión de Guanosina trifosfato (GTP) a Guanosina monofosfato cíclico (GMPc). La GMPc activa la proteína quinasa G (PKG), y hasta cierto punto la proteína quinasa A (PKA)

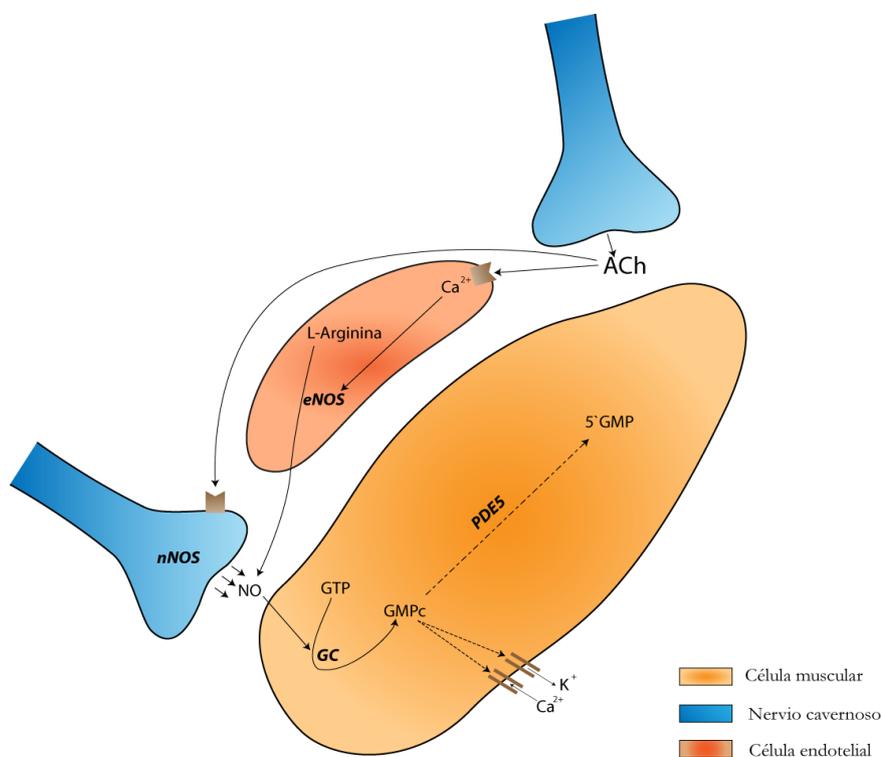


Figura 1.2. Proceso de erección.

quienes fosforilan proteínas que secuestran Ca⁺⁺. Esto produce una disminución de los niveles de Ca⁺⁺ en el citoplasma y relaja el músculo liso, permitiendo así que se produzca la erección.

En la culminación del acto sexual se produce el fenómeno conocido como emisión, una contracción sincronizada del conducto deferente, la glándula prostática y glándulas seminales, lo que permite la eliminación de fluidos para conformar el semen. La contracción de los músculos estriados del suelo perineal y pélvico (genitales) produce la eyaculación.

La fosfodiesterasa 5 (PDE5) inactiva la GMPc y produce la detumescencia. Así, la excitación sexual del varón desaparece casi por completo en 1 a 2 min (Uribe Arcila, 2006; Hull y Rodríguez-Manzo, 2017; Benavides Trujillo y Pinzón Tovar, 2008).

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado y acatando las recomendaciones de la OMS tendientes a profundizar el conocimiento científico sobre las prácticas de la etnomedicina para descartar las que fuesen peligrosas y reforzar las que sean seguras, se

decidió estudiar a *Phlegmariurus saururus* en relación a su proclamada actividad afrodisíaca dado que esta especie es consumida por gran parte de la población procurando sus beneficios.

Así, se planteó como objetivo general, desde el ámbito de la salud, contribuir al conocimiento científico mediante la investigación sobre la actividad biológica que el saber etnobotánico atribuye a *Phlegmariurus saururus*, esto es, tratar la disfunción eréctil.

Para cumplir con este objetivo se plantearon una serie de objetivos específicos, que se detallan a continuación:

1. Realizar un estudio epidemiológico a fin de determinar la prevalencia de comercialización de *P. saururus* en la ciudad de Córdoba y si es utilizada acorde a los efectos proclamados en la etnomedicina.
2. Preparar distintos tipos de extractos: acuosos, etanólico y alcaloidal. Dado que en las prácticas etnofarmacológicas la principal forma de consumo ocurre mediante extractos acuosos, se podría inferir que los principios activos presentes en la especie tienen carácter polar o son capaces de formar sales siendo por lo tanto, solubles en agua.
3. Evaluar los extractos en ensayos *in vitro*, midiendo el aumento de la producción de la enzima eNOS y cuantificando la producción de Óxido Nítrico.
4. Experimentar los extractos en ensayos *in vivo*, en modelo de animales, a través de estudios de comportamiento sexual y del modelo de eyaculación ficticia, para evaluar la actividad afrodisíaca proclamada.
5. Separar, aislar y purificar los principios activos (PA) constituyentes de los extractos que resulten positivos en los ensayos anteriores, para poder evaluar su actividad farmacológica.
6. Realizar pruebas *in vivo* e *in vitro* con los PA aislados a fin de identificar el principio activo (s) responsable (s) del efecto producido.
7. Evaluar la toxicidad de las sustancias que resulten activas, con vistas a producir un medicamento potencialmente útil para combatir la disfunción eréctil.

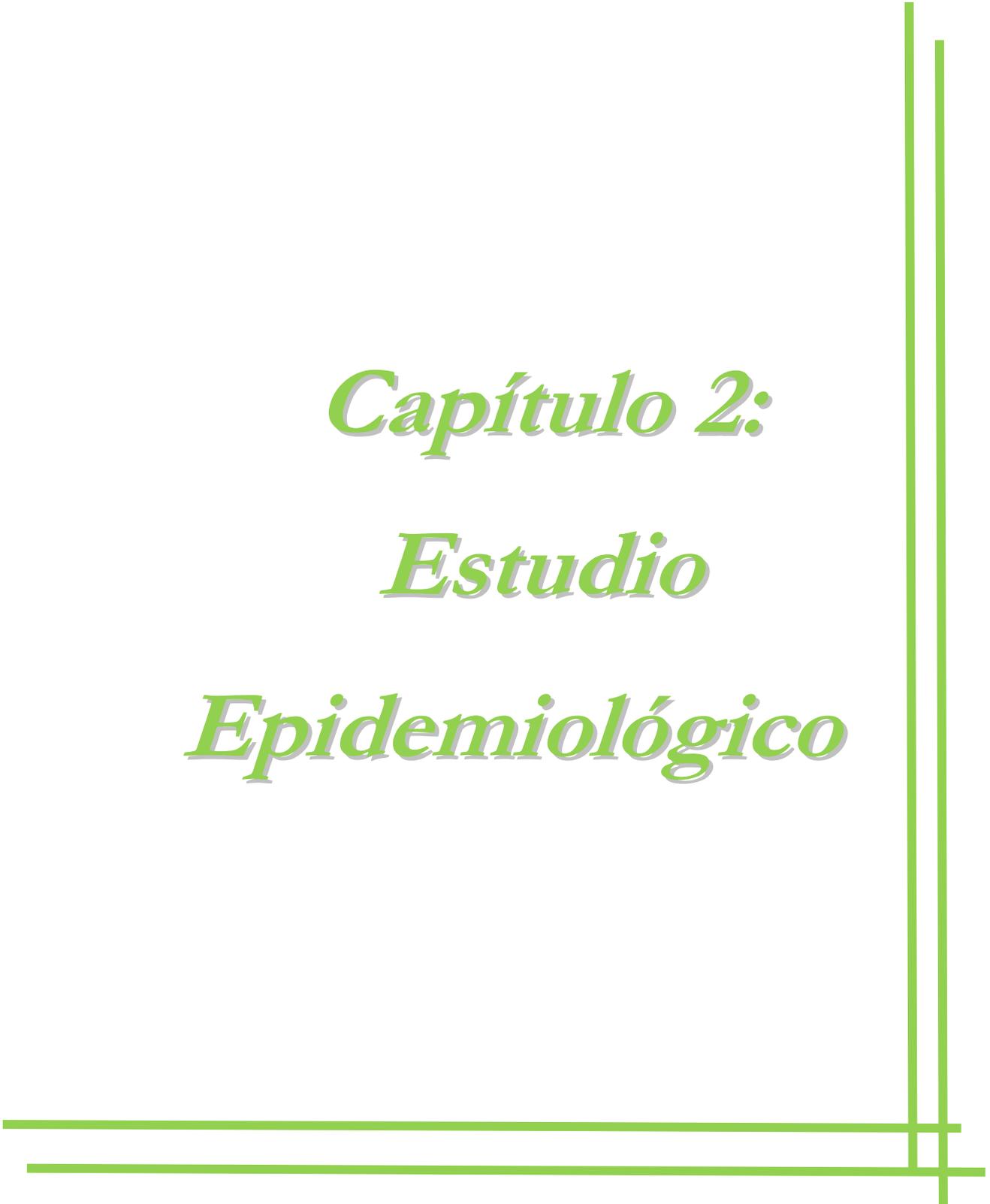
1.2. Bibliografía

- Akerele, O., 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mund. Salud, 14, 390-395.
- Amorín, J.L., 1974. Cola de quirquincho *Urostachis saururus* (Lam.) Heter (Lycopodiaceas). Una peligrosa planta usada en la Medicina Popular Argentina. Farmacobotánica., 16, 3-6.
- Arana, M., Bianco, C., Martínez Carretero, E., Oggero, A., 2011. Licofitas y Helechos de Mendoza. Multequina, 20 (2) 1-73.
- Arana, M., y Øllgaard, B., 2012. Revisión de las Lycopodiaceae: (Embryopsida, Lycopodiidae) de Argentina y Uruguay. Darwiniana, 50 (2), 266-295.
- Arata, P. N., Canzoneri, F., 1892. Contributo allo studio del pillijan: (*Lycopodium saururus* Lam.). Tipografia dello Statuto. Palermo.
- Ayer, W., Hargoog, T., Deulofeu, V., Juliani, H., 1965. Lycopodium alkaloids. Sauroxine. Tetrahedron, 21: 2169-2172.
- Benavides Trujillo, M. C., Pinzón Tovar, A., 2008. Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. Rev. Col. Anest., 36 (1), 45-52.
- Birri, M., Cabral Pérez, M., Agnese M., 2013. Estudio descriptivo sobre la utilización de plantas como alternativas terapéuticas. Ars Pharm., 54 (3), 01-06.
- Blondel, R., 1887. Manuel de Matière Médicale. 928-931, París.
- Bolgeri, G., Quagliarini D., 2008. Todo sobre sexualidad masculina de eso sí se habla. 1º Ed. Kier. Buenos Aires, Argentina.
- Braekman, J.C., Nyembo, L., Bourdoux, P., Kahindo, N., Hootele, C., 1974. Distribution of alkaloids in the genus Lycopodium. Phytochemistry, 13, 2519–2528.
- de la Sota, E.R., 1977. Pteridophyta. In: Cabrera, A.L. (Ed.), Flora de la Provincia de Jujuy. INTA, Buenos Aires, Argentina. pp. 19–27.
- Deulofeu, V., De Langhe, J., 1942. Studies on argentine plants. III. Alkaloids from *Lycopodium saururus*. J. Amer. Chem. Soc., 64, 968-969.
- Hieronymus, G., 1882. Plantae Diaphoricae Florae Argentinae. Ed. Kraft. Buenos Aires, Argentina.
- Hnatyszyn, O., Moscatelli, V., Garcia, J., Rondina, R., Costa, M., Arranz, C., Balaszczuk, A., Ferraro, G., Coussio, J.D., 2003. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of guinea pig. Phytomedicine, 10, 669-674.

- Hull, E.M., Rodríguez-Manzo, G., 2017. Male Sexual Behavior. In: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier. Ámsterdam. ISBN 9780128093245
- Köhler, T., McVary, K., 2016. Contemporary Treatment of Erectile Dysfunction: A Clinical Guide, 2nd Ed. Humana Press, United States.
- MacLean, D.B., 1985. Lycopodium alkaloids. Chapter 5. The Alkaloids. A. Brossi (Ed.). Vol. 26. Academic Press, New York, p. 241.
- Martínez Crovetto, R., 1981. Las plantas utilizadas en medicina popular en el Noroeste de Corrientes. República Argentina. Miscelanea 69, 15. Fundación Miguel Lillo, Argentina.
- Mukherjee, P., Venkatesh, P., Ponnusankar, S., 2010. Ethnopharmacology and integrative medicine. Let the history tell the future. J Ayurveda Integr Med., 1, 100–9.
- Moreno, R., Giorgis, M., Arana, M., Barboza, G., 2014. Helechos y Licofitas del centro de Argentina: cultivo y especies ornamentales. 1^{ra} Ed. Talleres Gráficos LUX S.A. Buenos Aires, Argentina.
- Øllgaard, B., 1992. Neotropical Lycopodiaceae, an overview. Ann. Missouri Bot. Gard., 79, 687-717.
- Øllgaard, B. 2012. New combinations in Neotropical Lycopodiaceae. Phytotaxa 57, 10-22.
- OMS, 1979. The selection of essential drugs. WHO Technical Report Series, 641, 1-44.
- OMS, UICN, WWF. Directrices sobre conservación de 1. Plantas medicinales. [en línea]. Gland: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN); 1993. Acceso: 1/6/2012. En: http://www.urosario.edu.co/urosario_files/57/571bf298-6ad8-4b7f-b432-26a6fb78e6de.pdf
- Ortega, G., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2004a. Sauroine—a novel Lycopodium alkaloid from *Huperzia saururus*. Tetrahedron Lett., 45 (38), 7003–7005.
- Ortega, G., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2004b. Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. Phytomedicine, 11 (6), 539–543.
- Ortega, G., Vallejo, M., Cabrera, J.L., Pérez, M., Almirón, R., Ramírez O., Agnese, M., 2006. *Huperzia saururus*, activity on synaptic transmission in the hippocampus. J. Ethnopharmacol., 104, 374–378.
- Ortega, G., Agnese, M., Barboza, G., Cabrera, J.L., 2007. Seasonal study of the alkaloid pattern of *Huperzia saururus* with habitat in Córdoba province (Argentina). J. Arg. Chem. Soc., 95 (1–2), 1–9.

- Ortega, G., Vallejo, M., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2010. *Huperzia saururus*: Anticholinesterase Activity and Action on Memory and Learning. In: JN Govil; VK Singh. Recent Progress in Medicinal Plants, Drug Plants III. Vol. 29. Studium Press (Houston), Texas. U.S.A. pp. 345-362.
- Puiatti, M., Borioni, J.L., Vallejo, M., Cabrera, J.L., Agnese, M., Ortega G., Pierini, A., 2013. Study of the interaction of *Huperzia saururus* Lycopodium alkaloids with the Acetylcholinesterase enzyme. J. Mol. Graph. Model., 44, 136 – 144.
- Ratera, E.L., Ratera, M.O., 1980. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Editorial Hemisferio Sur S.A, Buenos Aires, Argentina. p. 67.
- Sandroni, P., 2001. Aphrodisiacs past and present: a historical review. Clin. Auton. Res. 11, 303-307.
- Southon, I.W., Buckingham, J., 1989. Dictionary of Alkaloids, Chapman Hall, London.
- Toursarkissian, M., 1980. Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. Hemisferio Sur, Buenos Aires. Argentina. p 80.
- Uribe Arcila, J.F., 2006. Una teoría general de la función y la disfunción eréctil. Urol. Colomb. XV (3), 33-45.
- Vallejo, M., Ortega, M., Cabrera, J.L., Carlini, V., Rubiales de Barioglio, S., Agnese, M., 2007. *Huperzia saururus* increases memory retention in rats. J. Ethnopharmacol., 111, 685–687.
- Vallejo, M., Ortega, G., Cabrera, J.L., Carlini, V., Rubiales de Barioglio, S., Almirón, R., Ramírez, O., Agnese, M., 2009. Sauroine, an alkaloid from *Huperzia saururus* with activity in Wistar rats in electrophysiological and behavioral assays related to memory retention. J. Nat. Prod., 72, 156–158.
- Vallejo, M., Ortega, M., Cabrera, J.L., Agnese, M., 2013a. *N*-demethyl-sauroxine, a novel Lycopodium group alkaloid from *Huperzia saururus*. Tetrahedron Lett., 54, 5197–5200.
- Vallejo, M., Dimmer, J., Ortega, G., Cabrera, J.L., Agnese, M. 2013b. Amino acids content and acetylcholinesterase inhibition of *Huperzia saururus* infusion and decoction. Pharm. Biol., 51(10), 1341–1345.
- van Driel, M., 2015. Physiology of Penile Erection. A Brief History of the Scientific Understanding up till the Eighties of the 20th Century. Sex Med. 3, 349–357.

Capítulo 2:
Estudio
Epidemiológico



¿Qué sucede en la ciudad de Córdoba con la comercialización de *Phlegmariurus saururus*?

2.1. Introducción

Como se mencionó en la introducción (Capítulo 1), estudios epidemiológicos determinaron que alrededor del 80 % de la población consume plantas medicinales para tratar algún problema de salud (Akerle, 1993).

Sin embargo, cuando nos referimos específicamente a *P. saururus* no existen reportes que indiquen cuál es el grado de comercialización o consumo de esta especie en la ciudad de Córdoba.

Para conocer si realmente se comercializa en nuestra ciudad, se realizó un estudio epidemiológico, en donde se relevaron los productos que se pueden adquirir libremente en el mercado de la ciudad de Córdoba, Argentina, a fin de determinar la prevalencia de comercialización de *P. saururus*.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Estudio epidemiológico

Para cumplir con el objetivo planteado, se realizó un diagnóstico de situación llevando a cabo un estudio de Corte o Transversal, el cual es un proceso epidemiológico no experimental, transversal, en el que una comunidad o muestra representativa de ésta es estudiada en un momento dado (Hernández-Ávila y col., 2000; Hernández y col., 2000).

La recolección de datos se hizo en forma aleatoria a partir de la realización de entrevistas a las personas encargadas de la atención al público en los distintos establecimientos comerciales con el propósito de evaluar si la planta estaba disponible para la venta y su grado de comercialización. Dado que para el común de las personas el nombre científico de las especies vegetales es desconocido, en este caso la planta fue denominada por su nombre común: cola de quirquincho.

Los establecimientos relevados incluyeron farmacias, herboristerías y dietéticas.

2.2.2. Población, Lugar y tiempo

El estudio fue desarrollado en la zona centro de la ciudad de Córdoba, por considerarla representativa de todos los barrios de la ciudad, ya que concentra la mayor densidad comercial de la ciudad de Córdoba. El estudio se llevó a cabo entre mayo y junio del año 2013. La población elegible estuvo constituida por los diferentes establecimientos donde se pudiesen adquirir especies vegetales medicinales.

2.2.3. Instrumento

Los datos fueron recabados a través de entrevistas, una técnica de recolección de datos mediante una interrogación estructurada, utilizando un formulario con preguntas como guía.

Luego de registrar de qué tipo de comercio se trataba (farmacia, herboristería o dietética), se consultaba en una pregunta cerrada, si disponían para la venta de "cola de quirquincho".

Cuando la respuesta era afirmativa, se indagaba sobre el uso popular por el cual era comercializada. Para evitar influenciar a los entrevistados, la pregunta era abierta, es decir que la persona podía responder libremente.

Posteriormente se preguntó sobre la forma de presentación, esto es, bajo cuál modo era ofrecida para la venta.

Finalmente, para conocer el grado de comercialización de la especie se dividió a la variable en una escala ordinal en la que el comerciante debía valorar cuál era la proporción de venta de *P. saururus*, en comparación con la especie más vendida. Ésta fue una pregunta cerrada cuyas opciones fueron 0 % (nunca)/ hasta 25 %/ entre 25 y 50 % / entre 50 y 75 % / más del 75 %.

2.2.4. Ética

Los entrevistados fueron informados del anonimato de los datos, incluidos la identificación del establecimiento y la identidad de la persona que respondiese la encuesta.

La participación por parte del establecimiento en el estudio fue absolutamente voluntaria.

2.2.5. Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Epi info 2000 versión 3.5.1. Los datos fueron expresados como el porcentaje (%) y el Intervalo de Confianza (IC 95 %).

Para la estimación de la Tasa de Participación y la Tasa de Respuesta se siguieron los lineamientos de Piédrola Gil (1991) y Díez Gañán (2007).

2.3. Resultados

Del relevamiento de la zona de estudio surgió que la población total elegible era de 65 establecimientos. De acuerdo a estos datos, para realizar el estudio se necesitaba una muestra de 54 comercios para tener un intervalo de confianza de 95 % con un error muestral del 5 % (Pérez Cardona y col., 2004). Los cálculos del tamaño muestral fueron realizados utilizando el Programa Epi info 2000 versión 3.5.1.

Se relevaron entonces 54 establecimientos, su distribución puede verse en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Distribución de frecuencia de los establecimientos entrevistados

Establecimientos	%	IC 95 %
Farmacias	67,90	53,70 – 80,10
Dietéticas	26,40	15,30 – 40,30
Herboristerías	5,70	1,20 – 15,70

Como resultado de las visitas a los establecimientos comerciales se registró una "Tasa de Participación" de 87,69 % y una "Tasa de Respuesta" de 83,08 %.

Se observó que el 57,40 % (IC 95 %= 44,10 % – 71,30 %) de los locales relevados, disponían de *P. saururus* para la venta. Las formas de presentación disponibles fueron droga vegetal a granel (DG), droga vegetal fraccionada (DF) y solución para administración en forma de gotas (SG). En la Figura 2.1 se observa en qué proporción se encuentra cada forma de presentación.

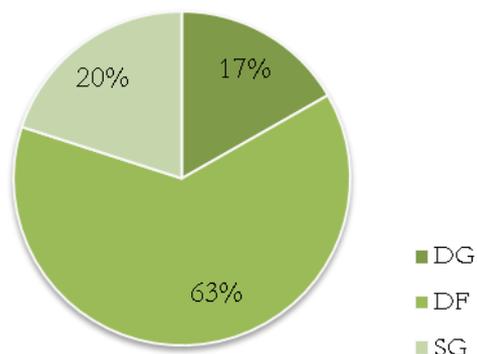


Figura 2.1. Forma en que se comercializa *P. saururus* en la ciudad de Córdoba. DG, Droga a granel; DF, Droga fraccionada y SG solución para ser administrada en forma de gotas.

Al relacionar el tipo de establecimiento con la forma de presentación, se vio que, en el 46,15 % de las dietéticas comercializaban *P. saururus* en forma de DG, el 15 % como DF, el 8,09% como SG, el 7,69 % comercializaba la combinación DF y SG. Igual proporción se vio para DG y SG, mientras que un 15,38 % de las dietéticas no comercializaba ninguno de estos productos.

En el caso de las Herboristerías el 66,67 % poseía para la venta DF y SG, mientras que el 33,33 % restante no comercializaba ningún producto.

Finalmente, para las Farmacias, el 47 % dispensaba DF, el 3 % la combinación de DF y SG. En el 50 % restante no se comercializaban estos productos.

Con respecto al uso popular por el cual *P. saururus* era comercializada, el 66,67 % de los encuestados afirmó que esta especie se vendía por sus propiedades afrodisíacas. Este elevado porcentaje pone en evidencia que verdaderamente la población que la consume conoce cabalmente lo que es proclamado por la etnomedicina. Con respecto a otros usos mencionados en los distintos establecimientos, se pueden mencionar el 9,09 % para la memoria, el 3,03 % como digestivo, igual proporción como diurético, y el 18,18 % restante desconoce las propiedades por las cuales comercializa ese producto y tampoco sabe para qué las personas lo adquieren.

En la Figura 2.2 se puede observar la frecuencia de uso, en relación al tipo de comercio. Claramente se muestra que el uso como afrodisíaco es el único que se describe en todos los tipos de establecimientos.

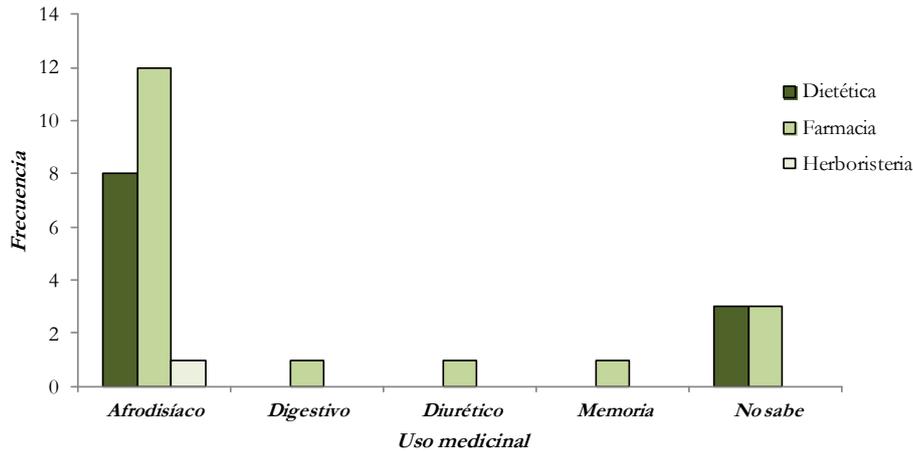


Figura 2.2. Uso por el cual se dispensa *P. saururus*, según el tipo de establecimiento.

En relación a la magnitud de venta, el 80,60 % (IC 95 % = 61,40 % – 92,30 %) del total de los establecimientos que disponen de *P. saururus* afirmó que el volumen alcanzó hasta un 25 % de la especie más vendida.

En el 19,40 % (IC 95% = 7,70 % – 38,60 %) de los establecimientos restantes si bien disponían de la especie para comercializar, el volumen de venta fue nulo.



Con estos datos podemos afirmar que la Prevalencia de comercialización fue de 46,30 %.

2.4. Conclusiones

P. saururus es una especie que se comercializa libremente en la ciudad de Córdoba, y se encuentra al alcance del consumidor en diferentes tipos de establecimientos, tanto bajo la dispensación de un profesional farmacéutico como sin ninguna responsabilidad profesional.

La prevalencia de comercialización de la especie en el año 2013 en la ciudad de Córdoba fue de 46,30 %.

La razón por la cual el producto es comercializado es por su efecto afrodisíaco. El 66,67 % de los encuestados coincidió en asignarle esta propiedad.

Su nivel de venta no supera el 25 % con respecto a la especie más vendida, lo que hace suponer que tampoco su consumo es superior a este porcentaje.

Habida cuenta que se comercializa en aproximadamente el 60 % de los establecimientos de venta y que alcanza un 25 % de la magnitud de la especie más vendida, se puede inferir que un importante porcentaje de la población la consume y lo hace principalmente por sus efectos afrodisíacos.

2.5. Bibliografía

- Akerele, O., 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mund. Salud*, 14, 390-395.
- Birri, M., Cabral Pérez, M., Agnese M., 2013. Estudio descriptivo sobre la utilización de plantas como alternativas terapéuticas. *Ars Pharm.*, 54 (3), 01-06.
- Díez Gañán, L., Galán Labaca, I., León Domínguez, C., Gandarillas Grande, A., Zorrilla Torras, B., Alcaraz Cebrián, F., 2007. Ingesta de alimentos, energía y nutrientes en la población de 5 a 12 años de la Comunidad de Madrid: resultados de la encuesta de nutrición infantil 2001-2002. *Rev. Esp. Salud Pública.*, 81 (5), 543-558.
- Hernández-Ávila, M., Garrido-Latorre, F., López-Moreno, S., 2000. Diseño de estudios epidemiológicos. *Salud pública Mex.*, 42 (2), 144-154.
- Hernández, B., Velasco-Mondragón, H., 2000. Encuestas transversales. *Salud Pública Mex.*, 42 (5), 447-455.
- Pérez Cardona, C., Suarez Pérez, E., 2004. Aplicaciones del programa Epi Info en las ciencias de la salud. San Juan (Puerto Rico): Editorial de la Universidad de Puerto Rico.
- Piédrola Gil, G., del Rey Calero, J., Domínguez Carmona, M., Cortina Creus, P., Gálvez Vargas, R., Sierra López, A., editores, 1991. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. Masson Salvat. Barcelona, España. p 1476.

Capítulo 3:
Química de
Phlegmariurus
saururus

La química de *Phlegmariurus saururus*

3.1. Introducción

Entre los metabolitos más importantes que contiene *P. saururus* se pueden mencionar a los alcaloides (Ayer y col., 1965; Ortega y col., 2004a, b, 2007; Vallejo, 2009; Vallejo y col., 2013a), flavonoides como aglicones (Ortega, 2002) y aminoácidos (Vallejo y col., 2013b).

Los alcaloides son una gran familia de compuestos químicos de los cuales se conocen aproximadamente unos 17.000 metabolitos y pueden definirse como sustancias orgánicas de origen natural, nitrogenadas, de carácter básico, de distribución restringida y dotadas de propiedades farmacológicas marcadas. Como característica además, se puede mencionar que en general son sólidos, de color blanco, de sabor amargo y tóxicos en distinto grado.

A fin de realizar distintos estudios que permitan determinar si existe una correlación entre lo que dicta el uso popular y lo que se observaría en estudios científicos, es necesario investigar los extractos que se asemejen a los que las personas consumen. Así, se prepararon y estudiaron en cuanto a su composición química, principalmente, decocciones de *P. saururus*.

3.2. Material y Métodos

3.2.1. Obtención e Identificación botánica del material vegetal

El material vegetal, conformado por las partes aéreas de *P. saururus*, fue recolectado a 2140 m.s.n.m. en la Pampa de Achala, Departamento de San Alberto, Provincia de Córdoba, donde *P. saururus* crece espontáneamente.

Las recolecciones se hicieron en varias oportunidades a lo largo de la tesis, pero siempre durante los meses de primavera.

Con el fin de asegurar que se recolectó la especie correcta, el material vegetal fue identificado por la Dra. Gloria Barboza (Dpto. de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba - Instituto



Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), instituto del que nuestro grupo también forma parte. Una muestra de herbario se encuentra depositada en CORD bajo el número 684.

3.2.2. Procesamiento del Material vegetal

Las partes aéreas de la planta fueron secadas en un lugar fresco, aireado y al abrigo de la luz, a fin de evitar la actividad enzimática como así también el desarrollo de hongos.

Luego de la pérdida de la humedad, las partes aéreas fueron molidas utilizando un molino de martillos Retsch-Mühle modelo 5K1, con tamiz N° 3.



Para la adecuada conservación del material vegetal, éste fue almacenado en bolsas de papel dentro de cajas de cartón y mantenido a temperatura ambiente.

El material vegetal así procesado se constituyó en la materia prima a ser utilizada en las diversas actividades posteriores.

3.2.3. Obtención de los extractos

3.2.3.1. Decocción

En vista que la medicina popular indica que *P. saururus* se consume en forma de extractos acuosos, se preparó este tipo de extracto bajo la forma de decocción.

Procediendo según Farmacopea Argentina VII (2014), a 5 g de material vegetal se le adicionaron 100 mL de agua y se llevó a ebullición durante 20 min. Luego, la decocción se filtró y concentró a presión reducida. A fin de conocer la cantidad de extracto que produce la especie, es oportuno también calcular el rendimiento.

3.2.3.2. Extracto etanólico

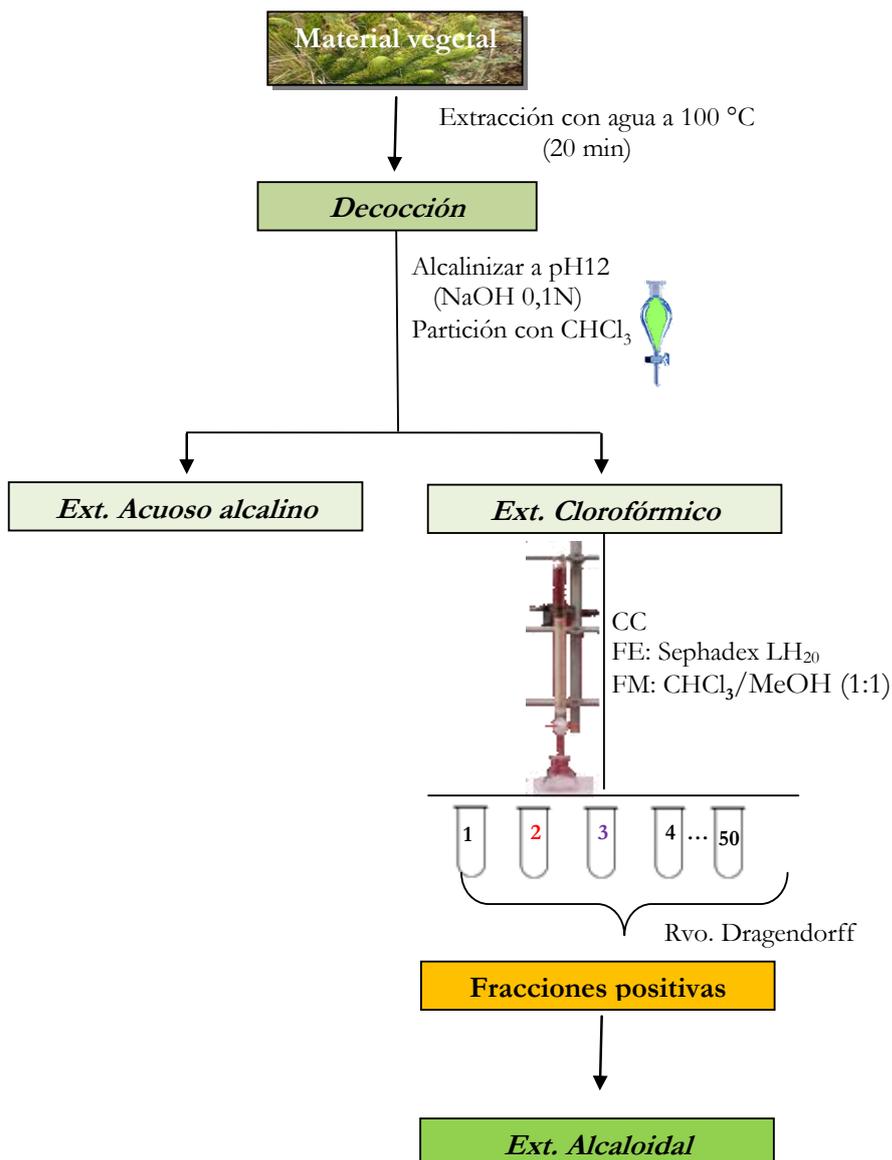
A 5 g del material vegetal se le adicionaron 100 mL de etanol y se permitió macerar el sistema durante 24 h. Luego, el extracto etanólico obtenido se filtró con papel de filtro para

eliminar el material vegetal así como restos de polvo que pudiera contener, y finalmente, se concentró a presión reducida a fin de calcular el rendimiento.

3.2.3.3. Extracto alcaloidal

Para la obtención de este extracto se trabajó según esquema 3.1, empleando una modificación de la técnica utilizada por Vallejo (2009). Así, se partió de una decocción, la que posteriormente fue alcalinizada con una solución de NaOH 0,1 N hasta alcanzar pH 12.

El extracto alcalinizado fue particionado en ampolla de decantación tres veces en forma consecutiva, con iguales proporciones de CHCl_3 . Los extractos clorofórmicos resultantes fueron reunidos y llevados a sequedad. Más tarde el extracto seco fue retomado con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1). Dicho extracto se sometió a cromatografía en columna (CC) utilizando geles filtrantes de tipo Sephadex LH_{20} (Sigma-Aldrich) como fase estacionaria (FE) y $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) como fase móvil (FM). Las fracciones que resultaron positivas al reactivo de Dragendorff (tetrayodo bismutato de potasio) se reunieron, constituyendo el extracto alcaloidal. Cabe señalar que aunque no es específico, el reactivo de Dragendorff es útil para detectar la presencia de alcaloides.



Esquema 3.1. Método de obtención del extracto alcaloidal.

3.2.4. Marcha Fitoquímica

Si bien ya se han mencionado las familias de constituyentes que se conoce están presentes en la especie, con el fin de determinar qué otras sustancias forman los extractos acuosos que se consumen en la medicina popular, se desarrolló una marcha fitoquímica.

Para ello, se analizó una decocción en relación con los diferentes tipos de compuestos químicos que podrían estar presentes. Se realizaron los ensayos generales que se describen a continuación, explicando sus fundamentos.

Metabolitos Secundarios

Ensayos de compuestos fenólicos

Prueba para taninos:

Los compuestos polifenólicos tales como los taninos forman complejos de color oscuro al ser puestos en contacto con el FeCl_3 . Dependiendo del tipo de tanino, el extracto acuoso (EA) adquiere un color azul-violáceo o verde.

Así, a 3 mL de un EA se le añaden unas gotas de solución diluida de FeCl_3 (10 %). La aparición de una coloración verde o azulada indica la presencia de taninos (Trease y Evans, 2002).

Prueba para flavonoides:

Prueba de glicósidos flavonoides

Se agregan unas gotas de ácido HCl concentrado a 2 mL de un EA y posteriormente, se adicionan 0,5 g de Mg. En esta reacción, el Mg metálico es oxidado por el ácido dando como productos H_2 y MgCl_2 . Se evidencia la liberación de burbujas de H_2 y una coloración rosada o rojo cereza dada por la formación de complejos entre los flavonoides y el MgCl_2 (Trease y Evans, 2002).

Prueba para flavonoides sulfatados

A 3 mL de un EA se le adicionan 8 gotas de HCl (c), luego se somete a Baño María a 60 °C durante 20 min. Después de enfriar, se añaden gotas de una solución acuosa de BaCl_2 . Éste reacciona con los grupos sulfato para formar BaSO_4 , que se evidencia como un precipitado blanco o cierta turbidez en el medio, lo que se interpreta como una reacción positiva.

Prueba para antocianinas:

A 3 mL de un EA se le añade 1 mL de HCl 2M y se somete a la llama. Una vez que el sistema se enfría, se agrega cuidadosamente butanol por las paredes y se considera positivo el ensayo si aquel adquiere coloración roja, producto de la extracción de las antocianinas.

Ensayos para saponinas:

Se agregan en un tubo de ensayo, 2 mL de EA, y se agita vigorosamente durante 1 min. La reacción se considera positiva si aparece una espuma persistente, dada por la capacidad que tienen las saponinas de disminuir la tensión superficial en soluciones acuosas (Harborne, 1973).

Ensayo para alcaloides:

A 5 mL de EA se le adicionan 3 gotas de NaOH 1N para obtener un medio alcalino y se extrae en ampolla de decantación con 1 mL de CHCl_3 . La fase clorofórmica se concentra a presión reducida hasta $\frac{1}{4}$ de su volumen inicial y se siembra en forma puntual en una cromatografía en capa delgada (CCD) y se revela con Reactivo de Dragendorff (tetrayodo bismutato de potasio). Una coloración naranja muestra la presencia de alcaloides por su reacción con el yodo (Wagner y col., 1984).

Ensayo para cumarinas:

5 mL de EA se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve en 2 mL de agua destilada caliente y se divide en dos partes. La primera se usa como testigo y la otra sirve para la prueba en sí misma. Una vez fría, al tubo problema se le añaden 0,5 mL de NH_4OH al 10 %. Se siembra en papel Whatman N°1 y se examina bajo luz UV. Una fluorescencia celeste intensa indica la presencia de cumarinas (Wagner y col., 1984).

Ensayo para antraquinonas:

A 2 mL del EA se añaden 5 gotas de HCl (c) y se someten a Baño María (60 °C) durante 20 min. Después de enfriar, el sistema se extrae en ampolla de decantación con benceno ya que las quinonas en estado libre son poco solubles en agua y muy solubles en solventes orgánicos. Posteriormente, a 1 mL del extracto bencénico se le añade igual volumen de NH_4OH , para que reaccione con los grupos hidroxilo de las antraquinonas dando un color rojo cuya intensidad es proporcional al número de grupos hidroxilo libres en el compuesto (Wagner y col., 1984).

Ensayo para esteroides:

Se evaporan a sequedad 10 mL de un EA. El residuo se disuelve en HCl al 1 % para hidrolizar los glicósidos. Posteriormente se filtra y se extrae en ampolla de decantación con CHCl_3 . A 1 mL del extracto clorofórmico se le añade igual volumen de anhídrido acético y gotas de H_2SO_4 , la presencia de un color verde-azul muestra una reacción positiva (Reich y Schibli, 2006).

Metabolitos primarios

Ensayo para azúcares reductores:

A 2 mL de un EA se le agregan 3 gotas de reactivo de Molisch (solución etanólica de α -naftol), posteriormente con mucho cuidado, se añade H_2SO_4 (c), formándose 2 fases. Un anillo rojo en la interfase se considera positivo (Harborne, 1973). La reacción está basada en la formación de furfural o derivados de éste, a partir de los carbohidratos. El furfural se combina con el naftol sulfonato originando un complejo púrpura.

Ensayos para aminoácidos:

* A 5 mL de un EA se le agregan 3 mL del Reactivo Bradford. El colorante (Comassie Blue G-250) se unirá a los aminoácidos básicos o aromáticos, formando un complejo verde-azul (Bradford, 1976).

* Otro ensayo consiste en adicionar unas gotas de Ninhidrina al 5 % a 1mL de decocción. Aparece un color violeta-purpura demostrando la presencia de aminoácidos (Wagner y col., 1984).

3.2.5. Extracción y Purificación de los alcaloides

Para la obtención de los alcaloides mayoritarios (6-hidroxylycopodina, sauroína y sauroxina) se trabajó con una modificación de la técnica empleada por Vallejo (2009). Para ello, se parte del extracto alcaloidal preparado según se mencionó anteriormente, el cual es sometido a CC utilizando geles filtrantes de tipo Sephadex LH_{20} como fase estacionaria y acetona como fase móvil. Se eluyó la columna y las fracciones resultantes se siguieron mediante CCD de sílica gel con indicador de fluorescencia. La fase móvil fue

Ciclohexano/ CHCl₃/ Dietilamina (5:4:1). Las fracciones semejantes fueron reunidas en 5 fracciones finales. Las mismas fueron testeadas en CGL-EM en un equipo Clarus 600 - Perkin Elmer.

El programa utilizado fue el siguiente: 60 °C (1 min), 60-230 °C a 40 °C/min, 230 °C (1 min), 230-250 °C a 20 °C/min, 250 °C (2 min), 250-275 °C a 2 °C/min, 275 °C (1 min). El inyector y la temperatura del detector fueron de 280 °C, el volumen de inyección 0,1 µL, y se usó EtOH como disolvente (Birri y col., 2017).

Comparando los tiempos de retención obtenidos del cromatograma y los espectros de masas correspondientes con los existentes en bibliografía (Ortega y col., 2004a, b, 2007; Vallejo y col., 2013a), se determinó que las fracciones 2, 3 y 4 tenían al menos uno de los alcaloides de interés.

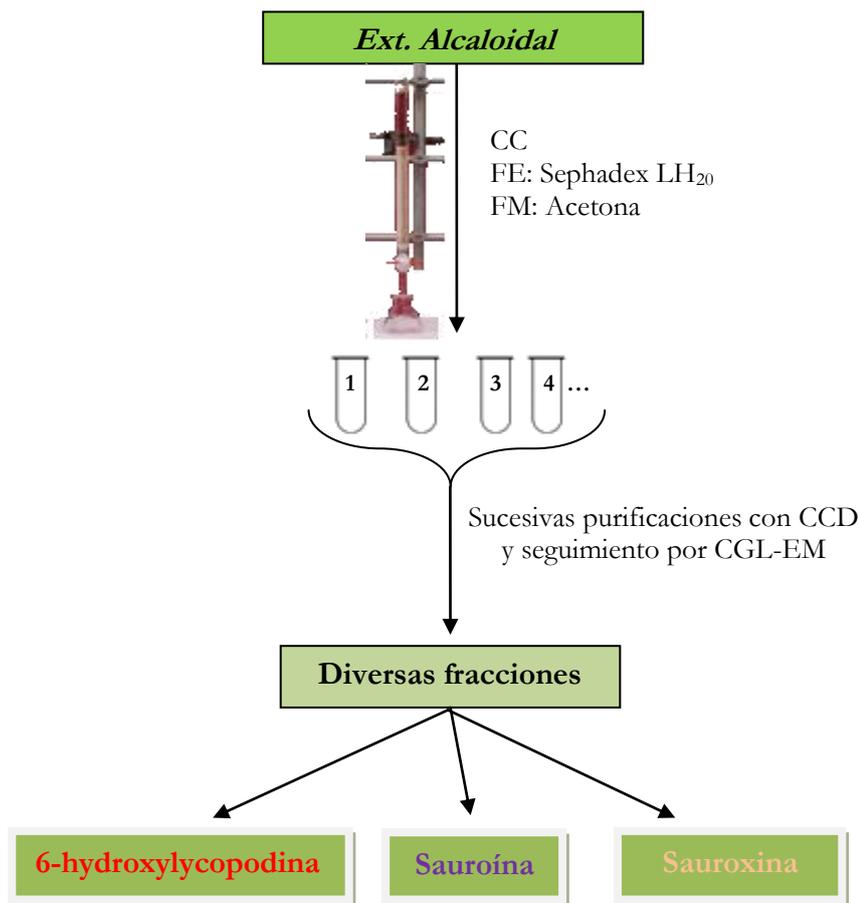
Para purificar estas fracciones, se realizaron separaciones sucesivas utilizando CCD de tipo preparativa tal como se muestra en el esquema 3.2.

La fracción 2 fue purificada primero mediante CCD en sílica gel con indicador de fluorescencia (sílica-gel 60 F254 Merck) como FE y utilizando como FM Ciclohexano/Dietilamina (1:1). Posteriormente, se volvió a purificar en dos oportunidades, mediante la misma FE y con Ciclohexano/ CHCl₃/Dietilamina (5:4:1) como FM. Así, se obtuvieron 4 fracciones, permitiendo separar 6-hidroxylycopodina y sauroxina.

La fracción 3, se purificó en CCD con Ciclohexano/Dietilamina (1:1) como FM, obteniendo 2 sub fracciones, una de ellas correspondiente a sauroína y la segunda fue sucesivamente purificada con Ciclohexano/ CHCl₃/Dietilamina (5:4:1) para obtener 6-hidroxylycopodina y sauroxina.

Finalmente, la fracción 4, se purificó de igual manera con Ciclohexano/Dietilamina (1:1). De las 3 sub fracciones obtenidas, una correspondía a sauroína y otra fue purificada como se mencionó en el párrafo anterior, con Ciclohexano/ CHCl₃/Dietilamina (5:4:1) para dar 6-hidroxylycopodina y sauroxina.

En todos los casos, los alcaloides se identificaron mediante sus espectros de masas característicos (Ortega y col., 2004a, b, 2002; Vallejo y col., 2013a).



Esquema 3.2. Método de separación empleado para obtener los alcaloides mayoritarios de *P. saururus*.

3.2.6. Validación de la metodología de extracción e identificación

Para la validación del método de extracción (decocción) e identificación, se utilizó el extracto clorofórmico (EC), obtenido como se indica en el esquema 3.1, por encontrarse este extracto enriquecido de alcaloides. Para ello se emplearon tres muestras vegetales y se trabajó siguiendo los lineamientos de la Agencia Europea de Medicamentos (emeA, 1995, EMA, 2010), valorando así selectividad, exactitud y precisión.

Se utilizó un equipo de CGL-EM (Clarus 600 de Perkin Elmer) tanto para la identificación como para la cuantificación de los alcaloides constituyentes del EC. El software Turbo Mass, fue utilizado para controlar y adquirir los datos. Todas las separaciones se llevaron a cabo a través de una columna capilar DB5 MS de silicio fundido

Perkin Elmer de 60 m, 0,25 mm de DI y 0,25 mm de espesor de película. El gas portador utilizado fue helio a 49,6 psi. Se seleccionó el modo de inyección dividida. La ionización se llevó a cabo en el espectrómetro de masas bajo vacío por impacto de electrones, con una energía de ionización de -70 eV.

Para asegurar selectividad es necesario la separación de los alcaloides mayoritarios, para esto se utilizó un programa diseñado como se detalla a continuación: 60 °C (1 min), 60-230 °C a 40 °C/min, 230 °C (1 min), 230-250 °C a 20 °C/min, 250 °C (2 min), 250-275 °C a 2 °C/min, 275 °C (1 min). El inyector y la temperatura del detector fueron de 280 °C, el volumen de inyección 0,1 µL, usando EtOH como disolvente. La identificación se realizó mediante la comparación de sus respectivos espectros de masas con los obtenidos en estudios previos (Ortega y col., 2004a, b; 2007; Vallejo y col., 2013a).

Para realizar una cuantificación con el menor error posible asegurando linealidad del método, se creó una curva de calibración con cinco soluciones madre de sauroína (analito), cada una por triplicado y en un intervalo de concentración de 1,5-10,00 mg/mL. Se empleó el método de estándar interno utilizando ciclohexanona. La linealidad se determinó calculando las gráficas de regresión por el método de regresión lineal y se expresó como coeficiente de determinación (r^2).

Para determinar la exactitud del método, tres EC de la decocción se analizaron (cada uno por triplicado) durante el mismo día, permitiendo conocer el contenido de alcaloides mayoritarios expresados como sauroína. Las medias de estas muestras se consideraron el 100 %. Posteriormente, se analizó el EC al 80 % y 120 %, por triplicado, para conocer la proporción de alcaloides en cada caso y determinar la proporción de recuperación. Para mejorar la precisión, los resultados fueron obtenidos por el mismo operador, con el mismo equipo y en cortos intervalos de tiempo.

Mediante esta metodología se pudo conocer la cantidad de alcaloides mayoritarios presentes en las decocciones, de modo de asegurar homogeneidad en todos los extractos utilizados.

3.3. Resultados

3.3.1. Preparación de los extractos

Luego que los distintos extractos fueron preparados se procedió a concentrarlos a sequedad para determinar el rendimiento.

Así, se encontró que la decocción tiene un rendimiento de 12 - 13 %, el extracto etanólico de 4,03 – 4,07 % y el alcaloidal de 0,07 – 0,12 %.

Otro valor que es importante aludir es la Relación Extracto Droga (DER, por sus siglas en inglés). Este valor representa la relación entre la cantidad de material vegetal utilizado y la cantidad de extracto obtenido. El número escrito antes de los dos puntos es la cantidad relativa de material vegetal utilizado y el que está escrito después es la cantidad relativa de la preparación herbal obtenida. Aquí se determinó que el DER de la decocción se encuentra en un rango de 7,6 - 8,3: 1, el del extracto etanólico, entre 24,55 - 24,81:1 y finalmente el del extracto alcaloidal fue de 833,33 – 1428,57: 1.

3.3.2. Marcha Fitoquímica

De acuerdo a lo explicado en Material y Métodos, en la tabla 3.1 se pueden observar los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica realizada a partir de la decocción de *P. saururus*.

Como se puede ver, además de los compuestos que ya se conocían estaban presentes en *P. saururus* y que podrían ser activos en cuanto a sus posibles efectos afrodisíacos como los alcaloides y aminoácidos, (Martínez Fernández y col., 2002) se destaca la presencia de saponinas, ya que son un tipo de metabolitos secundarios con actividad biológica que también podrían ser responsables de la actividad afrodisíaca. Es importante aclarar que si bien se ha mencionado como antecedentes la presencia de flavonoides, el resultado negativo aquí obtenido se explica claramente debido a que en un extracto acuoso como lo es una decocción, no pueden estar presentes flavonoides como aglicones por sus características de polaridad.

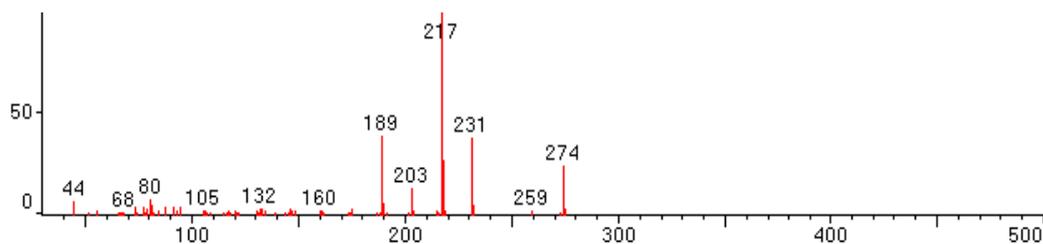
Tabla 3.1: Resultados de la marcha fitoquímica en una decocción de *P. saururus*

Familia de compuestos	Presencia
Metabolitos secundarios	
Alcaloides	+
Antraquinonas (glicósidos)	-
Flavonoides (glicósidos)	-
Flavonoides sulfatados	-
Antocianinas	-
Esteroides	+
Proantocianidinas	-
Saponinas	+
Taninos	+
Cumarinas	-
Metabolitos Primarios	
Azucares reductores	+
Aminoácidos	++

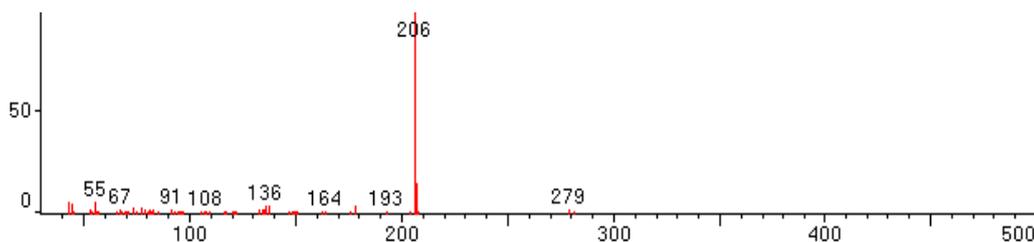
3.3.3. Extracción y Purificación de los alcaloides

En la figura 3.1 se pueden observar los espectros de masas característicos para los alcaloides mayoritarios sauroxina y sauroína.

Luego del procesamiento se obtuvieron entre 0,00089 y 0,0013 % de sauroína y entre 0,00044 y 0,00066 % de sauroxina, considerando el rendimiento a partir de la cantidad de material vegetal utilizado para preparar la decocción.



A. Sauroxina



B. Sauroína

Figura 3.1. Espectro de masas de los alcaloides sauroxina (A) y sauroína (B).

3.3.4. Validación

En el cromatograma obtenido del EC (Fig. 3.2) se observaron 4 picos principales, el primero a un tiempo de retención (Tr) de 5,07 min correspondiente a Ciclohexanona (estándar interno), luego a Tr 13,46 el pico de 6-hydroxylycopodina, posteriormente a Tr 16,88, sauroxina y finalmente sauroína a Tr 17,19. La correcta identificación de cada uno de ellos, se realizó mediante sus respectivos espectros de masas en comparación con los obtenidos en estudios previos (Ortega y col., 2004a, b; 2007; Vallejo y col., 2013a).

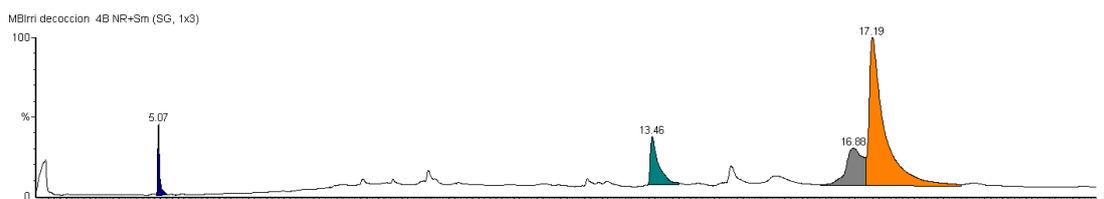


Figura 3.2. Cromatograma obtenido del análisis del EC de la decocción de *P. saururus*. Tr 5,07: Ciclohexanona, Tr 13,46: 6-hidroxylycopodina, Tr 16,88: sauroína, Tr 17,19: sauroxina.

Los resultados obtenidos en la curva de calibrado realizada con sauroína, permiten afirmar que se trabajó con una buena linealidad, mostrando un coeficiente de correlación de $r^2 = 0,9985$ ($n = 5$) para un rango de linealidad entre 1,5 y 10 mg/mL (Fig. 3.3.).

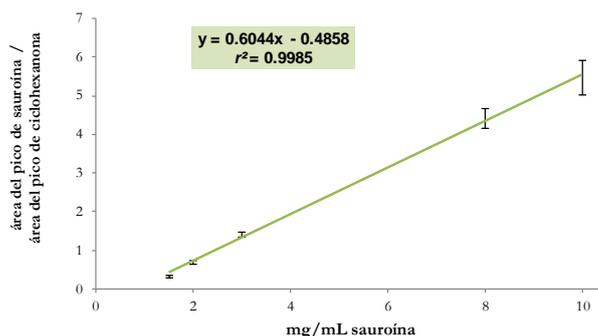


Figura 3.3. Curva de calibrado de sauroína.

La concentración de los alcaloides mayoritarios de los tres extractos clorofórmicos obtenidos de las decocciones, no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p=0,321$). Así, se determinó que estos extractos contienen entre 44,97 % y 59,82 % de alcaloides mayoritarios, expresados como sauroína.

Finalmente, los resultados obtenidos de la proporción de recuperación, al comparar la concentración media de los alcaloides de los distintos extractos entre los valores teóricos esperados y los valores reales para una concentración de 80 % y 120 % del extracto clorofórmico, permiten afirmar que no existen diferencias significativas entre ambos valores ($p=0,33$ y $p=0,80$, respectivamente).

Con estos resultados se puede inferir que la decocción de *P. saururus* tiene $3,02 \pm 0,33$ % de alcaloides totales, expresados como sauroína.

Mediante estos procedimientos se pueden garantizar condiciones de selectividad, exactitud y precisión, tanto en relación a los métodos de extracción, como de identificación.

3.4. Conclusiones

Teniendo en cuenta que la población consume *P. saururus* como decocciones es importante destacar que los principales constituyentes con posible actividad afrodisíaca son: alcaloides, aminoácidos y saponinas. Los alcaloides representan sólo un $3,02 \pm 0,33$ % del total de la decocción.

Se validaron las técnicas de extracción e identificación de los alcaloides, lo cual permite no sólo identificarlos de manera inequívoca sino también cuantificarlos y así conocer cuál es el rango porcentual en el que deberían estar presentes estos principios activos en las muestras.

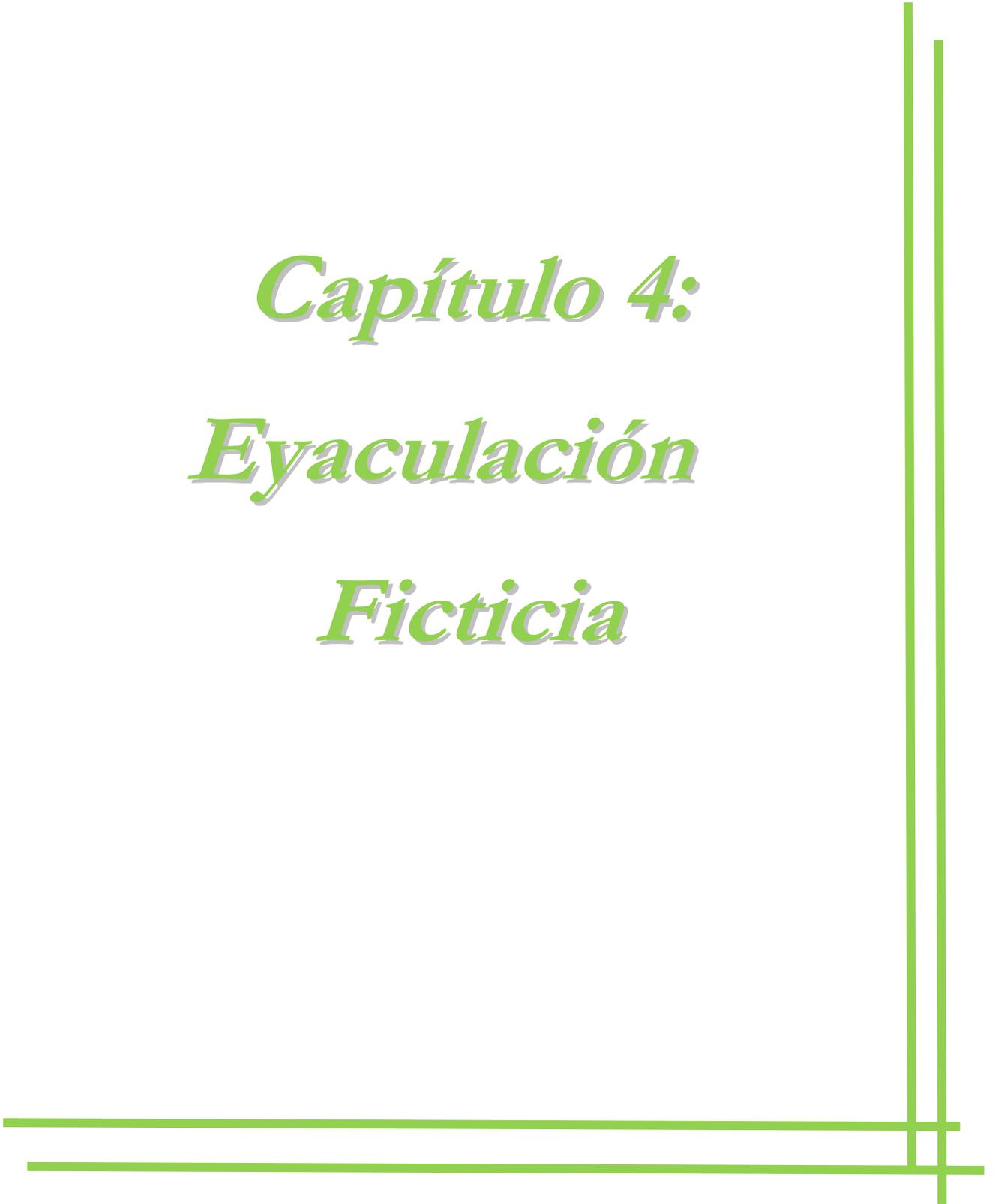
Al mismo tiempo, contar con una metodología que posibilite validar los extractos preparados en cuanto a su contenido de alcaloides mayoritarios permite garantizar homogeneidad en las muestras.

3.5. Bibliografía

- Ayer, W., Hargoo, T., Deulofeu, V., Juliani, H., 1965. Lycopodium alkaloids. Sauroxine. *Tetrahedron*, 21, 2169-2172.
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Birri, M., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese, M., 2017. Aphrodisiac activity of *Phlegmariurus saururus* in copulating and noncopulating male rats. *Phytomedicine*, 24, 104–110.
- European Medicines Agency (EMA), 1995. European Medicines Agency, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Ref: CPMP/ICH/381/95.
- European Medicines Agency (EMA), 2010. Guideline on Declaration of Herbal Substances and Herbal Preparations in Herbal Medicinal Products /Traditional Herbal Medicinal Products EMA/HMPC/CHMP/CVMP/287539/2005 Rev. 1.
- Farmacopea Argentina VII Edición, vol. I - IV. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Acceso: 1/10/2015. En: <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna.asp>, disponible en línea desde 8/09/2014.
- Harborne, J., 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Ltd. London. Great Britain.

- Martínez Fernández, L., Fiterre Lancís, I., 2002. Tratamiento medicamentoso oral de la disfunción sexual eréctil. Bol. Coleg. Mex. Urol., 17 (3), 158-171.
- Ortega, G., 2002. Estudio de Metabolitos Secundarios en Especies Argentinas del Género *Lycopodium* (Lycopodiaceae). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, UNC.
- Ortega, G., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2004a. Sauroine-a novel *Lycopodium* alkaloid from *Huperzia saururus*. Tetrahedron Lett., 45 (38), 7003–7005.
- Ortega, G., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2004b. Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. Phytomedicine, 11 (6), 539–543.
- Ortega, G., Agnese, M., Barboza, G., Cabrera, J.L., 2007. Seasonal study of the alkaloid pattern of *Huperzia saururus* with habitat in Córdoba province (Argentina). J. Argent. Chem. Soc., 95 (1-2), 1–9.
- Reich, E., Schibli, A., 2006. High Performance for the Analysis of Medicinal Plants. Thieme, New York, Stuttgart, USA.
- Trease, G., Evans, W., 2002. Pharmacognosy, 15th Ed. Saunders Publishers, London. Great Britain.
- Vallejo, M., 2009. Alcaloides en *Huperzia saururus*: actividad sobre memoria y aprendizaje. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, UNC.
- Vallejo, M., Ortega, G., Cabrera, J.L., Agnese, M., 2013a. *N*-demethyl-sauroxine, a novel Lycopodium group alkaloid from *Huperzia saururus*. Tetrahedron Lett., 54, 5197–5200.
- Vallejo, M., Dimmer, J., Ortega, G., Cabrera, J.L., Agnese, M., 2013b. Amino acids content and acetylcholinesterase inhibition of *Huperzia saururus* infusion and decoction. Pharm. Biol., 51 (10), 1341–1345.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Capítulo 4:
Eyacuación
Ficticia



Modelo de Eyaculación Ficticia

4.1. Introducción

La eyaculación es el proceso fisiológico que describe la expulsión del semen desde la uretra (Hull y Rodríguez-Manzo, 2017) y está compuesto de dos etapas, una de emisión y otra de expulsión (Newman y col., 1982).

La fase de emisión implica el cierre del cuello vesical (previniendo de esta forma que se produzca una eyaculación retrógrada) y la contracción de las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata, conducto deferente y glándulas uretrales y bulbouretrales).

La fase expulsiva de la eyaculación consiste en la expulsión poderosa del semen desde el meato uretral, la cual es causada por la contracción rítmica de todos los músculos genitales asociados con el tracto genital. El éxito de la eyaculación depende de respuestas coordinadas que implican eventos autonómicos y somáticos.

La eyaculación es un fenómeno sofisticado que requiere la participación de numerosos mecanismos (Morali y col., 2003).

Se sabe que los comandos neurales que regulan la eyaculación se encuentran organizados a nivel espinal. Diferentes estudios determinaron la existencia de un “generador de patrones”, situado a nivel lumbosacro, que participa en el control de la eyaculación (McKenna, 1999; Coolen y col., 2004; Carro-Juárez y Rodríguez-Manzo, 2006a; b).

Un generador central de patrones espinales (GCPE) se define como un circuito neuronal que puede producir patrones coordinados para controlar comportamientos motores rítmicos (Grillner, 2006). Este generador que regula la eyaculación, hace la conexión entre los aferentes sensoriales de los genitales y las neuronas autonómicas y somáticas del circuito (Carro-Juárez y Rodríguez-Manzo, 2006 a; b).

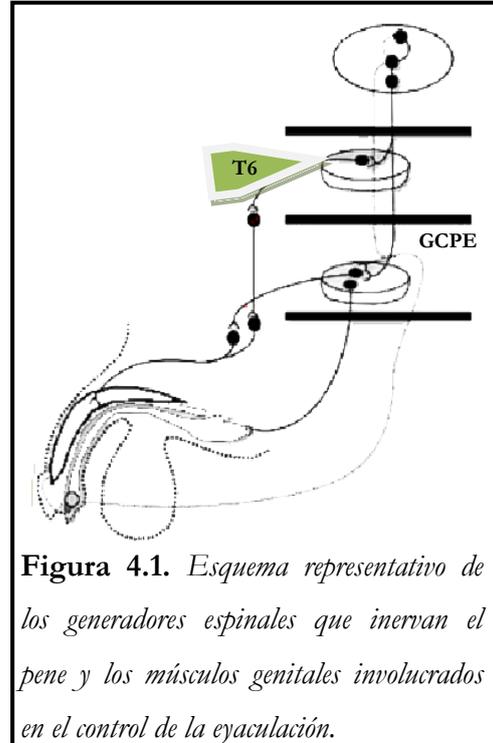


Figura 4.1. Esquema representativo de los generadores espinales que inervan el pene y los músculos genitales involucrados en el control de la eyaculación.

La transección de la médula espinal a nivel de la vértebra torácica 6 (T6), (por encima del GCPE, como se muestra en la Figura 4.1) permite la expresión de un patrón motor rítmico en los músculos genitales perineales, que coincide con una potente expulsión de contenido uretral o sea, una eyaculación. Se demostró que la secuencia rítmica originada en el motor eyaculador es similar a los patrones motores eyaculatorios registrados en ratas macho copuladoras anestesiadas, a las que se les realiza un corte en la medula espinal, contando así con un modelo válido para estudiar mecanismos eyaculatorios espinales, independizados del control central. Dicho modelo se denominó "Modelo de Eyaculación Ficticia" (Carro-Juárez y Rodríguez-Manzo 2000; Carro Juárez y col., 2003).

4.2. Material y métodos

4.2.1. Animales

En todos los experimentos se emplearon ratas Wistar macho sexualmente expertas de 300 ± 50 g y una edad promedio de 75-85 días. Los animales fueron alojados en grupos (cuatro ratas por jaula), bajo ciclo invertido de luz-oscuridad de 12:12 h, a 22 °C y con libre acceso a comida y agua.

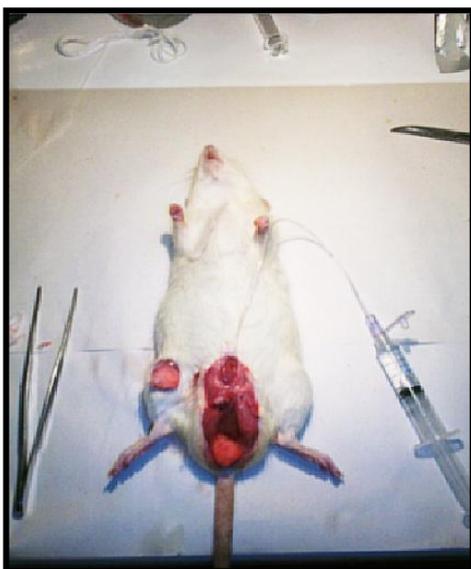
Se formaron tres grupos de animales, el grupo control (administrado con solución salina), el grupo tratamiento (decocción, extracto alcaloidal o los alcaloides, sauroína y sauroxina, según cada caso) y un último grupo al que se le administró sildenafil citrato (10 mg/kg) como sustancia de referencia. Es necesario explicitar que el empleo de sildenafil como sustancia de referencia, radica en el hecho de ser el fármaco más utilizado a nivel mundial en tratamientos de disfunción eréctil, sin que esto implique que las sustancias a ensayar actúen mediante los mismos mecanismos.

El Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Tlaxcala aprobó todos los procedimientos experimentales, los que obedecen a las regulaciones establecidas en la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de los animales de laboratorio "NOM-062-ZOO-1999".

4.2.2. Preparación de los animales a ser experimentados en el modelo de eyaculación ficticia.

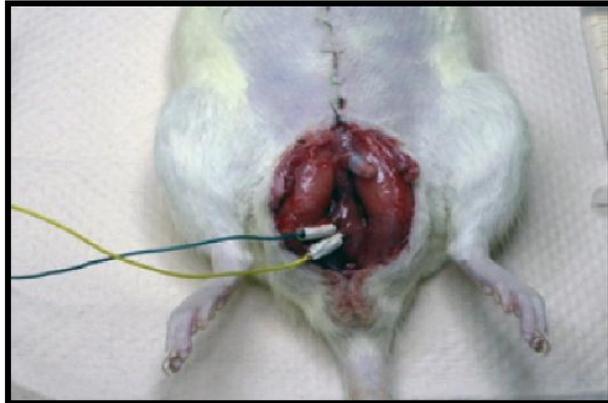
A fin de realizar estudios utilizando el Modelo de Eyaculación Ficticia es imprescindible trabajar con animales sexualmente expertos, o sea, animales que han completado la serie copulatoria en reiteradas oportunidades. Brevemente, como se verá en el capítulo 5, una serie copulatoria incluye montas, intromisiones, eyaculación y un período refractario posterior que finaliza con una nueva intromisión.

Para su correcta preparación los animales deben ser sometidos a un procedimiento quirúrgico. Así, posteriormente a ser anestesiados con Uretano (0,7 g/kg, i.p.), se les expone la porción bulbar del pene y sus conexiones con el músculo bulboesponjoso, para lograr una mejor visualización del patrón motor de la eyaculación y los movimientos genitales asociados. El músculo bulboesponjoso ha sido seleccionado como un monitor de la actividad de los músculos genitales, ya que se descarga durante la eyaculación en sincronía con todos los músculos y, adicionalmente, por su localización superficial en el perineo.



Acto seguido, se coloca una cánula en la vena femoral derecha que permite la administración de las distintas sustancias. También se inserta en la uretra pélvica (a través de una incisión de la vejiga), un catéter PE-50, para más tarde poder realizar inyecciones de solución salina que actuará como estimulante mecánico.

Finalmente, se insertan en el músculo bulboesponjoso dos electrodos de platino conectados a un polígrafo (Grass M7), para registrar la actividad electromiográfica (EMG). La EMG es registrada diferencialmente, amplificada y filtrada (1000x, de paso de banda 0,1-1 kHz) (Sistema de adquisición de datos Poliview; Grass Astro-Med Inc. EEUU, 2003).



Una vez que los animales están preparados, se secciona la medula espinal a nivel de T6 para permitir la expresión del patrón motor genital de la eyaculación (PMGE), procedimiento conocido como espinalización.

4.2.3. Activación de la respuesta de la eyaculación ficticia

La respuesta originada en el modelo de eyaculación ficticia consiste en la expresión del PMGE, que desencadena la expulsión de secreciones intrauretrales y la expresión de movimientos reflejos del pene (*flips, cups*). Para dicho modelo, se utilizan ratas Wistar macho anestesiadas y espinalizadas.

Luego de la transección de la médula espinal, el PMGE se expresa inmediatamente y de forma espontánea con una latencia media de 3 min. Con el fin de evaluar la capacidad de la médula espinal para producir la respuesta después de la espinalización, se deja expresar un primer PMGE espontáneo y se evoca una siguiente respuesta eyaculatoria, por la estimulación sensorial de la uretra.

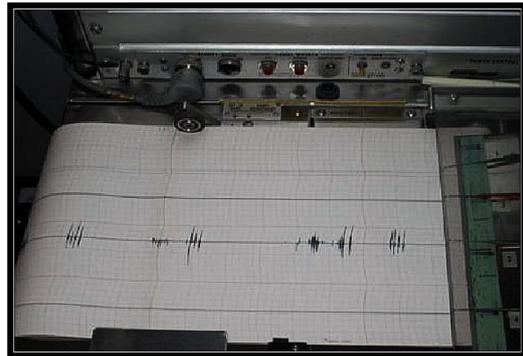
Esta estimulación (mecánica) de la uretra, consiste en la distensión producida por la inyección de solución salina (con una jeringa) durante 10 segundos en la vejiga, mientras se realiza la oclusión del meato urinario, logrando así un aumento de la presión (20 - 30 mm Hg).

Una vez que la expresión del PMGE se obtuvo por estimulación mecánica, se administran las distintas sustancias y se analizan las respuestas bajo su influencia, activando el PMGE varias veces a intervalos de tres min, hasta su inhibición. El criterio utilizado para considerar la inhibición de esta respuesta es, la ausencia de la expresión del PMGE en dos períodos de estimulación consecutivos. En este momento, se termina el protocolo de estimulación.

Los parámetros considerados para el análisis de los PMGEs registrados son:

Latencia de Descarga (LD): tiempo transcurrido desde la estimulación mecánica hasta el comienzo de la expresión del PMGE, el que se observa como contracciones (descargas) en el músculo bulboesponjoso.

Número de Descargas (ND): cantidad de contracciones que se observan en los músculos durante un PMGE.



Frecuencia de Descargas (FD): cantidad de descargas por unidad de tiempo (segundos).

Número de Patrones Motores (NPM): número de veces que responde el sistema a la estimulación, antes de inhibirse, dado que el músculo se fatiga.

4.2.4. Análisis de los datos

Las comparaciones cuantitativas entre los grupos fueron calculadas a partir de las medias y los resultados fueron estadísticamente analizados usando ANOVA de una vía seguido por la prueba de Newman-Keuls. Un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para los análisis se utilizó el programa GraphPad InStat y los gráficos fueron realizados en el programa Excel.

4.3. Experimentación

Los experimentos realizados con este modelo fueron desarrollados en dos pasantías en el Laboratorio de Comportamiento Reproductivo de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección del Dr. Miguel Carro Juárez.

4.3.1. Experimento 1: Efecto producido por la decocción de *Phlegmariurus saururus*

Como se mencionó anteriormente, la principal forma en que se consume *P. saururus* en la medicina popular es como extractos acuosos, se decidió entonces comenzar a estudiar el efecto afrodisíaco de la decocción. El presente experimento, se realizó con el fin de establecer el efecto de la decocción de *P. saururus* sobre la eyaculación de ratas macho anestesiadas y espinalizadas.

Se trabajó con un grupo de 5 animales, los que fueron administrados por vía endovenosa con 3 μg /animal de la decocción de *P. saururus*. La decocción fue preparada como se indicó en el capítulo 3.

4.3.1.1. Resultados

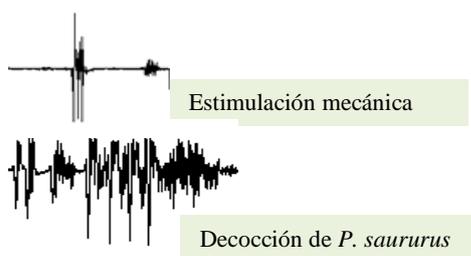


Figura 4.2. Activación del Patrón motor genital de la eyaculación (PMGE) mediante estimulación mecánica y por administración de la decocción de *P. saururus*. Tomada de Birri y col., 2014.

Como se puede ver en la Figura 4.2, la decocción de *P. saururus* fue capaz de activar el PMGE de las ratas macho anestesiadas y espinalizadas.

Las contracciones rítmicas provocadas estuvieron acompañadas en todo momento por la expulsión de secreciones seminales y coincidieron con erecciones fásicas que incluían movimientos peneanos.

La estimulación consecutiva de la uretra indujo un efecto inhibitorio, que se evidenció gradualmente. La primera fase de la eyaculación provocada fue la más potente y la última anterior a su inhibición, la más débil.

Del análisis estadístico de los datos se desprende que la decocción de *P. saururus* produjo una diferencia estadísticamente significativa en la LD ($F_{(2,12)}: 14,438; p<0,05$). Se observó que los animales tratados con la decocción comienzan a producir las descargas que desencadenan el tren motor, antes que los animales del grupo control ($p<0,001$). Así también, en la Fig. 4.3.A, puede verse cómo la decocción tiene un efecto prosexual, incluso mejor que el compuesto de referencia, ya que produce una disminución significativa de la LD comparada con la de las ratas control, así como en comparación con el sildenafil ($p<0,05$).

Con respecto al ND, nuevamente la decocción arrojó un mejor resultado que el grupo control (Fig. 4.3.B), ($F_{(2,12)}: 120,10; p<0,05$). *P. saururus* produjo un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de descargas que se pueden observar y registrar en los músculos genitales ($p<0,01$), produciendo así una mejora en la “potencia eyaculatoria”. Si bien sildenafil también provoca este efecto, el mismo es significativamente menor que el observado para *P. saururus* ($p<0,01$).

Finalmente, no se observaron diferencias en la FD, ni en el NPM que tengan significancia estadística (datos no mostrados), (Birri y col., 2014).

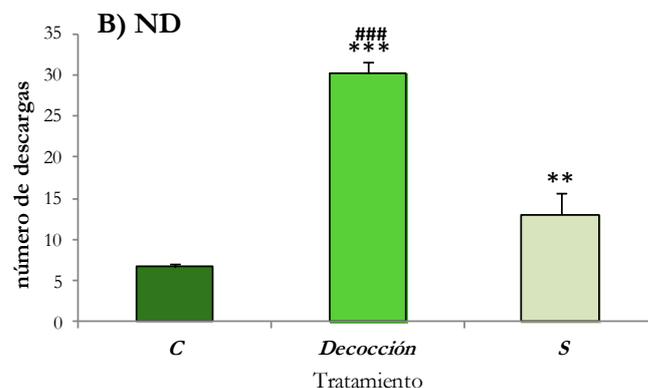
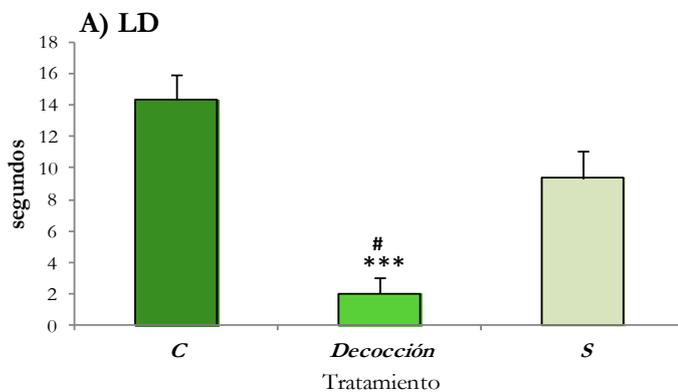


Figura 4.3. *Parámetros específicos del patrón motor eyaculatorio en respuesta a la decocción de P. saururus (3µg/ animal), en comparación con el Control (C) y la sustancia de referencia (S). Los valores se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). **A)** Latencia de descarga (LD); **B)** Número de descargas (ND); los resultados fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, seguido del Test de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$; * vs Control. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$; # vs sildenafil*

4.3.1.2. Conclusiones parciales

La decocción de *P. saururus* administrada en forma endovenosa a una dosis de 3 µg/animal en forma aguda, provoca una facilitación del umbral eyaculatorio y reduce la inhibición del PMGE promoviendo la eyaculación, efecto claramente evidenciado por la disminución estadísticamente significativa en la LD.

Al mismo tiempo, produce una mejora en la potencia eyaculatoria, dado que aumenta significativamente el número de contracciones de los músculos genitales (que se desencadenan en cada tren motor) evidenciando la expresión de un robusto patrón motor rítmico.

En este modelo, la decocción de *P. saururus* se muestra más efectiva que el sildenafil, el compuesto de referencia utilizado.

4.3.2. Experimento 2: Efecto del Extracto alcaloidal de

Phlegmariurus saururus

Como se vio en el Capítulo 3 (Química), los alcaloides son uno de los metabolitos secundarios presentes en la decocción de *P. saururus* que podrían ser responsables, al menos en parte, del efecto afrodisíaco proclamado para la especie.

Sabiendo que la decocción contiene alcaloides debido a su solubilidad en agua cuando están ionizados, y dado los importantes resultados hallados con la decocción, se prosiguió a ensayar el extracto alcaloidal a fin de establecer si este extracto produce los mismos efectos sobre la eyaculación de las ratas macho anestesiadas y espinalizadas.

El extracto alcaloidal fue obtenido como se explicó en el Capítulo 3.

Para llevar a cabo este experimento se trabajó, al igual que en el caso de la decocción, con ratas sexualmente expertas, anestesiadas y espinalizadas.

Se formaron 5 grupos de 4 animales cada uno. El primer grupo recibió solución salina y fue considerado como grupo control; los 3 grupos siguientes (tratamiento), fueron administrados con 0,3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del extracto alcaloidal de *P. saururus*. El último grupo, recibió sildenafil (10 mg/kg) como sustancia de referencia. Todos los animales fueron administrados por vía endovenosa.

4.3.2.1. Resultados

El extracto alcaloidal fue capaz de activar el PMGE. Las contracciones rítmicas que se generaron estuvieron acompañadas por la expulsión del contenido seminal y coincidieron con erecciones y movimientos peneanos. Se observaron claramente *flips* y *cups*.

Al igual que ocurrió cuando la decocción fue evaluada, la estimulación sucesiva de la uretra luego de la administración del extracto alcaloidal tuvo un efecto gradualmente inhibitorio. Para todas las concentraciones, la primera fase de la eyaculación provocada fue la más potente y la última anterior a su inhibición, la más débil.

Al analizar estadísticamente los datos, el extracto alcaloidal a las dosis ensayadas no produjo cambios significativos en el ND, aunque se observó una tendencia que parece mostrar un aumento dosis dependiente, el mismo no llega a ser significativo ($p > 0,05$), (datos no mostrados).

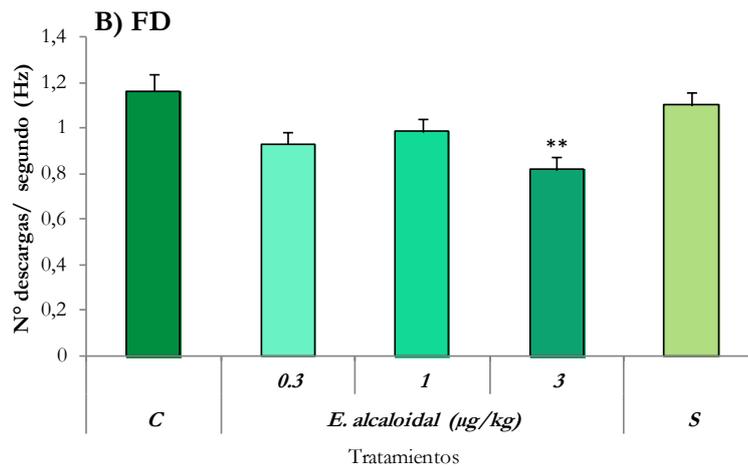
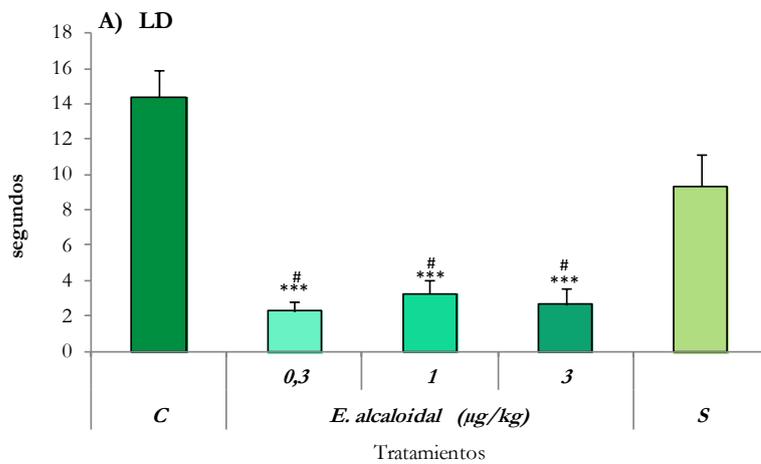
Por otro lado, sí se observaron cambios estadísticamente significativos en los restantes parámetros analizados.

La LD fue disminuida en todos los animales tratados con extracto alcaloidal, a cualquiera de las dosis estudiadas ($F_{(4,21)}: 19,781; p < 0,001$; Figura 4.4.A). Así, el extracto alcaloidal de *P. saururus* facilitó el umbral eyaculatorio y redujo la inhibición promoviendo la eyaculación. Con respecto al sildenafil se observó que éste, a diferencia del extracto, no produjo una disminución en la latencia de descarga. Al comparar con este compuesto de referencia, el efecto producido por el extracto alcaloidal fue muy superior ($p < 0,05$).

En cuanto a la FD en la Figura 4.4.B se observó una disminución significativa ($F_{(4,21)}: 4,529$) de la frecuencia en el grupo de animales administrados con 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de extracto alcaloidal ($p < 0,01$). Esta reducción hace que los animales tengan menos contracciones por segundo, sin embargo esta disminución mínima de 0,3 descargas por

segundo, no afecta el PMGE, ya que como se puede ver en la figura 4.4.C, esta misma dosis (3 µg/kg) produce un aumento significativo del NPM, provocando un mayor número de eyaculaciones, mejorando así, la capacidad eyaculatoria.

Si bien disminuyó la FD, no llegó a ser significativa cuando se la compara con el compuesto de referencia ($F_{(4,20)}$: 6,169; $p > 0,05$). Contrariamente, sí se observaron diferencias significativas en el NPM. El extracto alcaloidal de *P. saururus* administrado a 3 µg/kg, produjo mayor número de eyaculaciones ficticias que el sildenafil (fig. 4.4.C).



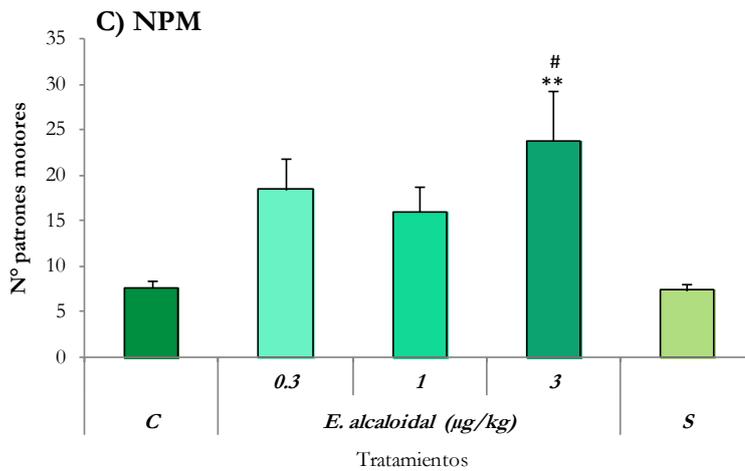


Figura 4.4. Parámetros del patrón motor genital de la eyaculación (PMGE) en respuesta al extracto alcaloidal de *P. saururus* (0,3; 1 y 3 µg/kg), en comparación con el Control (C) y el sildenafil (S). Los valores se expresan como la media ± SEM. **A)** Latencia de descarga (LD); **B)** Frecuencia de descargas (FD); **C)** Número de Patrones Motores (NPM). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del Test de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; * vs Control. # $p < 0,05$; # vs sildenafil

4.3.2.1. Conclusiones parciales

El extracto alcaloidal de *P. saururus* en el rango de 0,3 a 3 µg/kg, administrado en forma aguda, produce una facilitación del umbral eyaculatorio y reduce la inhibición promoviendo la eyaculación, o sea que elicitaba un marcado efecto proeyaculatorio que no es dosis dependiente. Al mismo tiempo puede observarse que el efecto producido por el extracto alcaloidal, fue superior al provocado por el sildenafil.

También se comprobó que el extracto alcaloidal produce una mejora en la capacidad eyaculatoria, ya que se observó un aumento significativo en el NPM, lo que implica que los animales pueden eyacular un mayor número de veces en forma consecutiva, tanto respecto al control como a la sustancia de referencia.

Finalmente, se concluye que el extracto alcaloidal de *P. saururus* a las dosis ensayadas posee un marcado efecto afrodisíaco, siendo incluso mejor que sildenafil.

4.3.3. Experimento 3: Efecto producido por alcaloides aislados de *Phlegmariurus saururus*

En vista de los resultados obtenidos con la decocción y el extracto alcaloidal de la especie, y de acuerdo a los objetivos planteados donde se proponía aislar las sustancias contenidas en los extractos que hubiesen dado los mejores resultados; sabiendo que los alcaloides están presentes tanto en la decocción como lógicamente en el extracto alcaloidal, se decidió ensayar los alcaloides mayoritarios, comenzando con sauroína y sauroxina (Ayer y col., 1965; Ortega y col., 2004a). La metodología de aislamiento e identificación de los alcaloides puede verse en el capítulo 3.

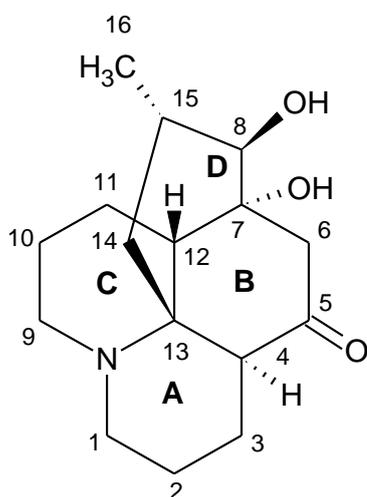


Fig. 4.5.A sauroína

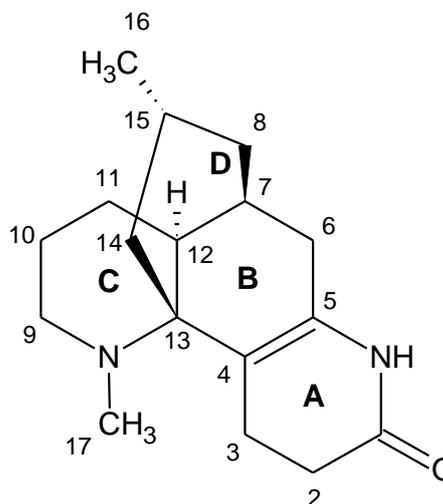


Fig. 4.5.B. sauroxina

4.3.3.I. Experimento desarrollado con el alcaloide aislado sauroína

En este ensayo se trabajó con 4 grupos de 6 animales cada uno. El grupo 1 (Control) recibió solución salina, el grupo 2 (Referencia) fue administrado con 10 mg/kg de sildenafil y los 2 grupos restantes (tratamiento) recibieron 0,1 y 1 µg/kg de sauroína respectivamente, por vía endovenosa.

4.3.3.I.1. Resultados

Al igual que los extractos previamente ensayados, sauroína fue capaz de activar el PMGE, generando contracciones rítmicas acompañadas por la expulsión del contenido uretral, erecciones y movimientos peneanos pronunciados tales como *flips* y *cups*.

El análisis estadístico de los datos obtenidos demostró que sauroína posee un efecto proeyaculatorio marcado dado que ambas dosis ensayadas produjeron una disminución significativa de la LD ($F_{(3,19)}: 32,465; p<0,001$). Dicho efecto demostró no ser dosis dependiente (Fig. 4.6.A).

También se observó una mejora en la capacidad eyaculatoria dado que tanto a 0,1 como a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sauroína produjo un aumento estadísticamente significativo del NPM, en relación al grupo control ($F_{(3,21)}: 6,110; p<0,05$).

Ambos efectos, son mejores que los observados para el compuesto de referencia (sildenafil), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p_{LD}<0,01$), ($p_{NPM}<0,05$).

Los restantes parámetros analizados no arrojaron diferencias significativas al compararlos con el grupo de referencia ni con el control (datos no mostrados).

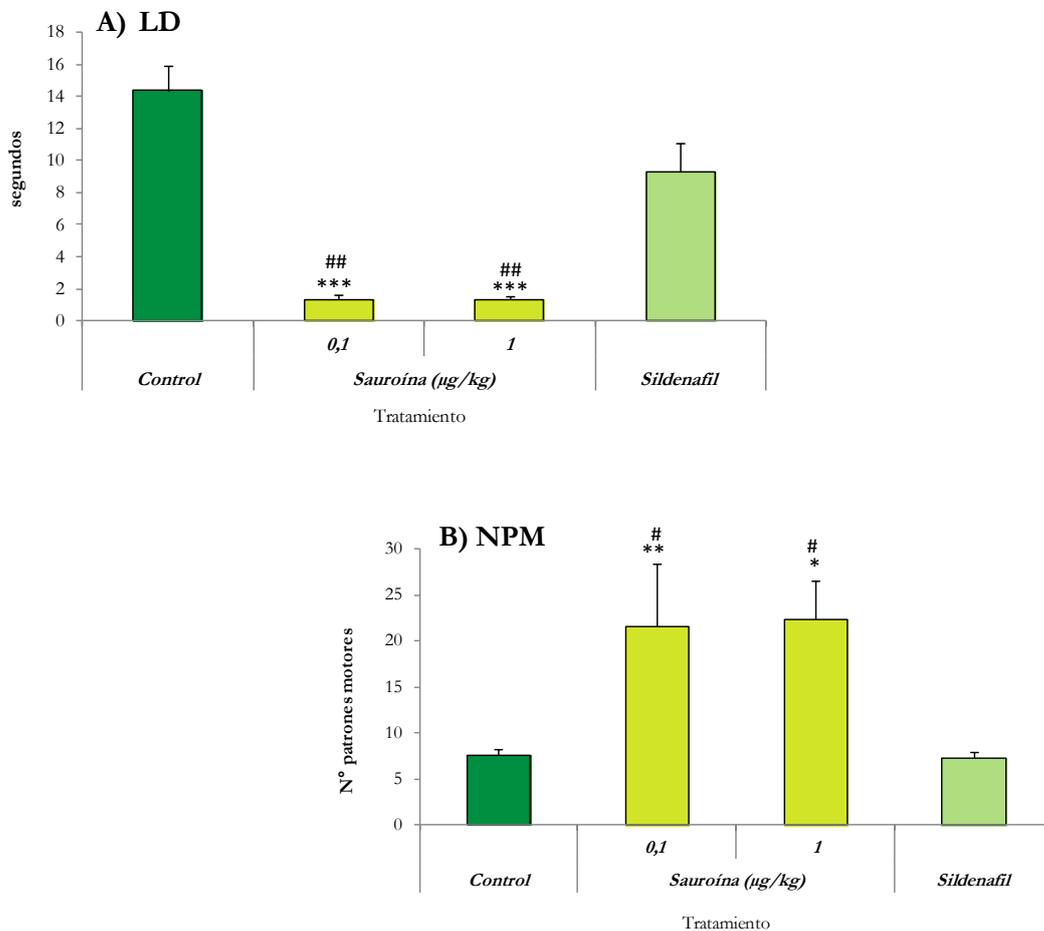


Figura 4.6. *Parámetros del Patrón motor genital de la eyaculación (PMGE) en respuesta a la estimulación farmacológica producida con sauroína (0,1 y 1 µg/kg) comparados con el control y la sustancia de referencia. Los valores se expresan como la media ± SEM. A) Latencia de descarga (LD); B) Número de Patrones Motores (NPM). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del Test de Newman-Keuls. * p <0,05; ** p <0,01, *** p <0,001; * vs Control. # p <0,05, ##p <0,01; # vs sildenafil*

4.3.3.I.2. Conclusiones parciales

Una única administración de sauroína, a dosis de 0,1 y 1 µg/kg, muestra un marcado efecto proeyaculatorio, el cual no es observado para sildenafil. Sauroína produce una facilitación en el umbral eyaculatorio y reduce la inhibición que bloquea la eyaculación, promoviéndola.

Sauroína también mejora la capacidad eyaculatoria en los animales anestesiados y espinalizados, cuando es administrada a dosis de 0,1 y 1 µg/kg. Los animales eyaculan un mayor número de veces antes de que se fatiguen los músculos, tanto respecto al control, como a la sustancia de referencia.

Al mismo tiempo, ninguno de los efectos aquí encontrados son dosis dependientes.

Bajo las condiciones de experimentación, se puede afirmar que sauroína produce efecto afrodisíaco.

4.3.3.II. Experimento desarrollado con el alcaloide aislado sauroxina

Para este ensayo, también se trabajó con 4 grupos de 6 animales cada uno: el grupo Control, que recibió solución salina, el grupo de referencia, administrado con 10 mg/kg de sildenafil y los 2 grupos tratamiento que recibieron 0,1 y 1 µg/kg de sauroxina, por vía endovenosa.

4.3.3.II.1. Resultados

El segundo alcaloide ensayado activó también el PMGE, comenzando con contracciones rítmicas acompañadas por la expulsión del contenido uretral, erecciones y movimientos peneanos. Como en los casos anteriores, se observó que las contracciones fueron disminuyendo paulatinamente hasta la inhibición completa.

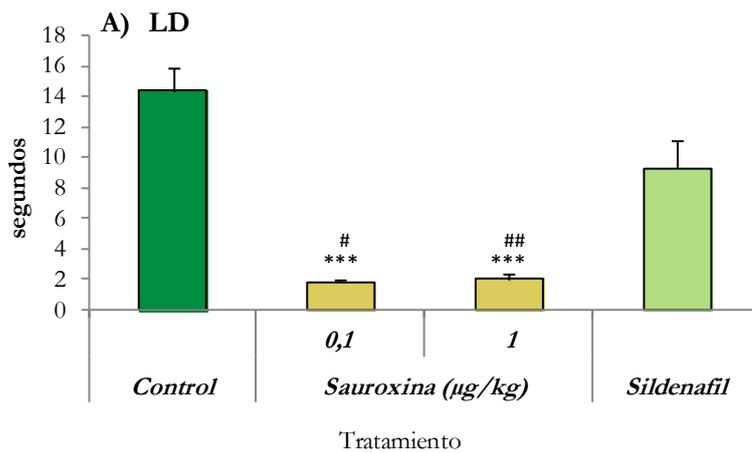
Como se puede ver en la figura 4.7.A, ambas dosis de sauroxina, produjeron una disminución similar en la LD ($F_{(3,17)}: 24,575; p<0,001$) lo que muestra el efecto prosexual de este alcaloide.

Con respecto al ND se observaron diferencias significativas ($F_{(3,17)}: 7,85$). Así, los animales administrados con 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sauroxina produjeron un mayor ND ($p<0,01$), mientras que, cuando fueron administrados con 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no se evidenciaron cambios significativos respecto al grupo control ($p>0,05$), (Figura 4.7.B).

Finalmente, también se evidenciaron cambios significativos en el NPM ($F_{(3,17)}: 5,15$)

Se produjo un aumento estadísticamente significativo en relación al grupo control ($p<0,01$) a la dosis de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 4.7.C). Esta diferencia fue también significativa cuando se comparó con sildenafil ($p<0,05$).

Para la FD en tanto, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados y los grupos control (datos no mostrados).



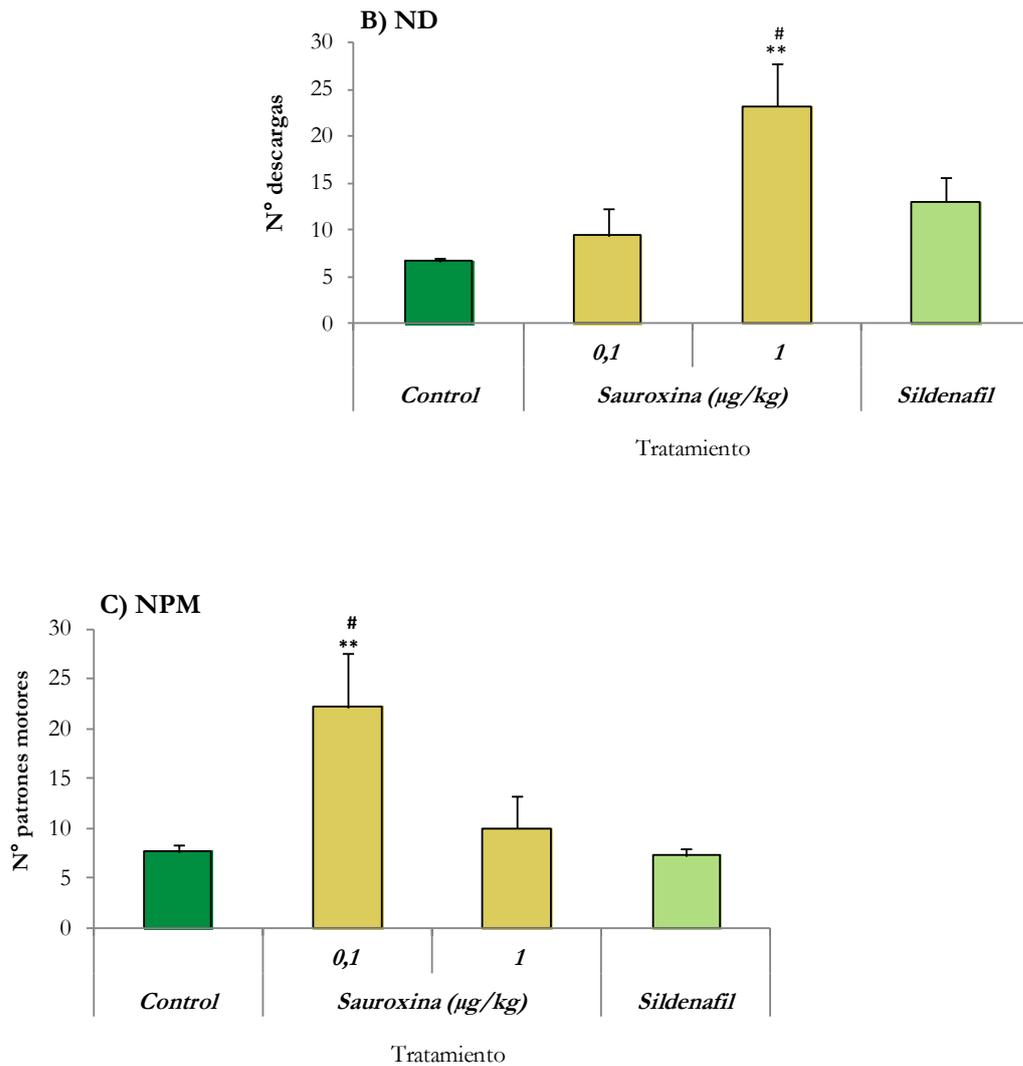


Figura 4.7. Parámetros del patrón motor genital de la eyacuación (PMGE) en respuesta a sauroxina (0,1 y 1 µg/kg) en comparación con el control y el sildenafil. Los valores se expresan como la media ± SEM. **A)** Latencia de la descarga; **B)** Número de descargas; **C)** Número de Patrones Motores. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del Test de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * vs Control. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$; ### vs sildenafil

4.3.3.II.2. Conclusiones parciales

Cuando es administrada a dosis de 0,1 y 1 µg/kg la sauroxina tiene un marcado efecto proeyaculatorio. La facilitación dada por la reducción del umbral eyaculatorio y la

disminución de la inhibición que promueve la eyaculación mostradas bajo el efecto de este alcaloide, no fue observada para sildenafil.

Adicionalmente, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sauroxina, produce una mejora en la potencia eyaculatoria de los animales anestesiados y espinalizados, dado que aumenta significativamente el número de contracciones de los músculos genitales, que se desencadenan en cada tren motor.

Sauroxina también mejora la capacidad eyaculatoria cuando es administrada a dosis de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Así, los animales pueden eyacular un mayor número de veces antes de producirse la fatiga, tanto respecto del control como de la sustancia de referencia.

A diferencia de sauroína, para sauroxina sí se observaron efectos dosis dependientes ya que, la mejora en la potencia eyaculatoria se da en la dosis más alta (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mientras que la capacidad eyaculatoria está mejorada en los animales tratados con la dosis menor (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Sauroxina se muestra en este experimento como un afrodisíaco.

4.4. Conclusiones

Phlegmariurus saururus produce facilitación del umbral eyaculatorio y reduce la inhibición que bloquea la eyaculación desde la medula espinal, promoviéndola. Esto se ve en la disminución estadísticamente significativa de la LD. Este efecto proeyaculatorio es promovido por la decocción, el extracto alcaloidal y por los alcaloides sauroína y sauroxina. Estos resultados nos permiten afirmar que serían estos alcaloides los responsables, al menos en parte, del efecto encontrado en los extractos ensayados.

Se ha demostrado que el aumento de las descargas eyaculatorias refleja la robustez del patrón motor rítmico y este parámetro está fuertemente asociado a la potencia eyaculatoria (Carro-Juárez y col., 2014). Este efecto fue encontrado cuando se administró la decocción así como también cuando se utilizó el alcaloide sauroxina en una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esto indica que *P. saururus* incrementa la potencia sexual, promoviendo una mejora en la

potencia eyaculatoria. El hecho que este resultado no fuera reproducido para el extracto alcaloidal y sí con sauroxina, es un hallazgo que merecerá futuros estudios. Se podría pensar que las concentraciones del extracto alcaloidal estudiadas no fueron las adecuadas, dado que si bien no se mostró un efecto neto al momento de la experimentación, sí se observó una tendencia al aumento del ND, por lo que se deberán realizar nuevas experimentaciones. También es posible el resultado observado para el extracto alcaloidal en función de que la concentración de sauroxina es menor que la de sauroína (alcaloide mayoritario) y de acuerdo a los resultados, sauroína no produce un aumento en la potencia eyaculatoria. Posiblemente el efecto neto producido por los extractos (decocción y alcaloidal) es resultado de la concentración relativa, de al menos, estos alcaloides.

En el modelo de eyaculación ficticia, el número de patrones genitales motores de la eyaculación está relacionado con la capacidad eyaculatoria de las ratas macho (Carro-Juárez y col., 2009; 2014). El extracto alcaloidal de *P. saururus* y dos de sus alcaloides mayoritarios, sauroína y sauroxina, producen un aumento en NPM, demostrando así que dichos alcaloides mejoran la capacidad eyaculatoria de la rata macho anestesiada y espinalizada, provocando en consecuencia un mayor número de eyaculaciones que los controles y una disminución en el tiempo del período refractario a continuación de la eyaculación.

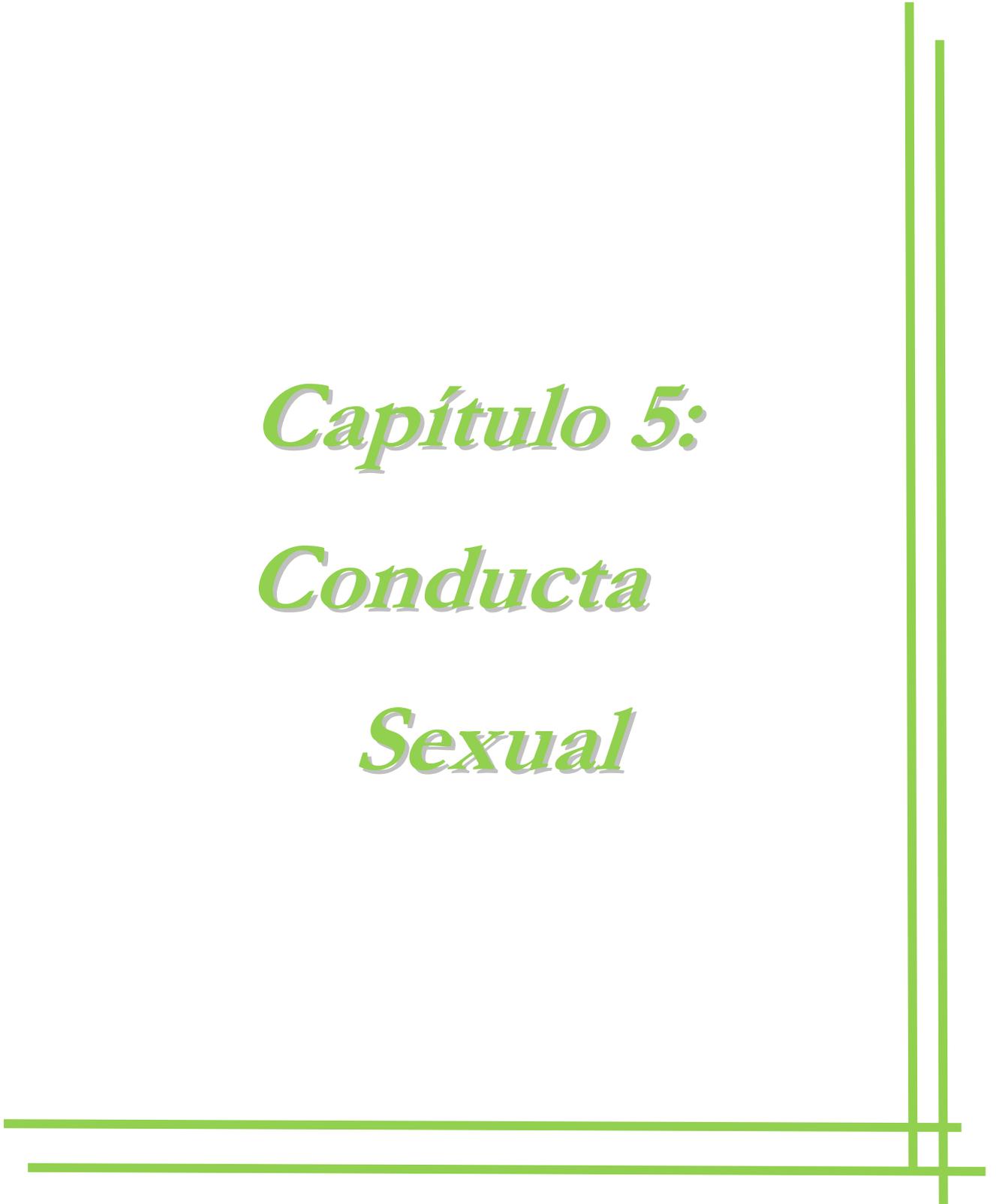
Todos estos resultados permiten afirmar que *P. saururus* es un potente afrodisíaco que actúa sobre el generador central de la eyaculación.

4.5. Bibliografía

- Ayer, W., Hargog, T., Deulofeu, V., Juliani, H., 1965. Lycopodium alkaloids. Sauroxine. Tetrahedron, 21, 2169-2172.
- Birri, M., Franco, M., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese M., 2014. *Huperzia saururus* Lam. Trevis. (Lycopodiaceae) facilitates ejaculation in spinal cord transected male rats. J. Ethnopharmacol., 157, 38–44.
- Carro-Juárez, M., Rodríguez-Manzo, G., 2000. Sensory and motor aspects of the coital reflex in the spinal male rat. Behav. Brain Res., 108, 97-103.

- Carro-Juárez, M., Cruz, S.L., Rodríguez-Manzo, G., 2003. Evidence for the involvement of a spinal pattern generator in the control of the genital motor pattern of ejaculation. *Behav. Brain Res.*, 975, 222-228.
- Carro-Juárez, M., Rodríguez-Manzo, G., 2006a. α -adrenergic agents modulate the activity of the spinal pattern generator for ejaculation. *Int. J. Impot. Res.*, 18, 32–38.
- Carro-Juárez, M., Rodríguez-Manzo, G., 2006b. Evidence for the presence of the spinal pattern generator involved in the control of the genital ejaculatory pattern in the female rat. *Brain Res.*, 1084, 54–50.
- Carro-Juárez, M., Alcazar, C., Ballesteros-Polvo, E., Villalobos-Peñalosa, P., 2009. Increase of ejaculatory capacity by systemic administration of the oquichpatli (*Senecio cardiophyllus*) aqueous crude extract in male rats. *J. Ethnopharmacol.*, 126, 506–511.
- Carro-Juárez, M., Franco, M.A., de Lourdes Rodríguez-Peña, M., 2014. Increase of the ejaculatory potency by the systemic administration of aqueous crude extracts of cihuapatli (*Montanoa Genus*) plants in spinal male rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 19 (1), 43-50.
- Coolen, L.M., Allard, J., Truitt, W.A., McKenna, K.E., 2004. Central control of ejaculation. *Physiol. Behav.*, 83, 203–215.
- Grillner, S., 2006. Biological pattern generation. The cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron.*, 52, 751–766.
- Hull, E.M., Rodríguez-Manzo, G., 2017. Male Sexual Behavior. In Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier. Amsterdam. ISBN 9780128093245.
- Mc Kenna, K.E., 1999. Ejaculation. In: Knobil E, Neill J. (eds). *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. New York, USA, pp 1002–1008.
- Morali, G., Pia, M.A., Contreras, J.L., Arteaga, M., Gonzalez-Vidal, M.D., Beyer, C., 2003. Detailed analysis of the male copulatory motor pattern in mammals: hormonal bases. *Scan. J. Psychol.*, 44, 279–288.
- Newman, H., Reiss, H., Northrup, J.D., 1982. Physical basis of emission, ejaculation, and orgasm in the male. *Urology*, 19, 341–350.
- Ortega, G., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2004b. Sauroine -a novel Lycopodium alkaloid from *Huperzia saururus*. *Tetrahedron Lett.*, 45, 7003–7005.

Capítulo 5:
Conducta
Sexual



Ensayo de Conducta Sexual

5.1. Introducción

Entre todas las especies de animales utilizadas en investigación científica, las más empleadas para el estudio de Comportamiento Sexual son las ratas.

El comportamiento sexual de la mayoría de las especies, incluidas las ratas, consta de tres fases. La primera de ellas es la denominada "**comportamiento precopulatorio**", en la que en el caso de las ratas, se observan una serie de conductas características por parte de ambos animales tales como, exploración ano-genital, vocalizaciones y si la hembra está receptiva, lordosis (una dorsiflexión reflexiva de la columna vertebral), acompañada por la deflexión de la cola al costado. Posteriormente el macho comienza a perseguir a la hembra para montarla.

Aquí, comienza la segunda fase llamada "**cópula**". Los machos realizan en este periodo, tres patrones de comportamiento distintos: montas, intromisiones y eyaculación. Los machos montan a las hembras desde la parte posterior dorsal, poniendo sus patas delanteras sobre la espalda de la hembra y



las traseras en el suelo. La hembra, puede asumir una postura de lordosis. El macho realiza empujes con la parte antero-posterior de la pelvis que inducen o intensifican la postura receptiva de la hembra (no hay intromisión del pene). Finalmente, desmonta a la hembra lentamente.

Posteriormente, en las intromisiones se produce la inserción del pene en la vagina. El



macho monta a la hembra, realiza empujes pélvicos, y de repente muestra un empuje más profundo, con una duración media de 200-300 ms, que coincide con la penetración vaginal, seguida de un brusco desmontaje hacia atrás y posterior limpieza de sus genitales.

Luego de varias intromisiones, se produce

la eyaculación, el macho realiza una intromisión más profunda, que coincide con expulsión del contenido seminal. Posteriormente, levanta sus patas delanteras y apoyado sobre las traseras desmonta poco a poco a la hembra. A continuación, por lo general, se asea la zona genital.

La tercera fase de la serie copulatoria se denomina **"comportamiento post eyaculatorio"** y ocurre inmediatamente después de la eyaculación. Es un periodo refractario que dura alrededor de 8 min, conocido como periodo post eyaculatorio (PPE) o intervalo post eyaculatorio (IPE).

Después del PPE, las ratas macho continúan persiguiendo y montando a la hembra, con intención de retomar una nueva serie copulatoria. Las ratas macho necesitan eyacular entre siete y doce veces para saciarse y logran así una inhibición sexual que dura aproximadamente 72 h (Beach, 1942; Beach y Jordan 1956; Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

La bibliografía pone de manifiesto la importancia que tiene la experiencia previa a la hora de lograr una mejor conducta sexual. El aprendizaje sexual reduce el tiempo que se necesita para iniciar y alcanzar la eyaculación, así como la cantidad de estimulación necesaria para eyacular, mejora la capacidad copulatoria, agudiza el olfato de los machos a señales químicas relacionadas a las hembras y aumenta la fertilidad masculina. Además, se elimina el efecto perjudicial que ocasiona sobre el estrés del animal, el hecho de encontrarse en un ambiente nuevo (Donald, 1969).

Por todo lo expuesto, antes de comenzar los ensayos de comportamiento sexual, las ratas Wistar macho utilizadas deben ser previamente entrenadas para asegurar su condición de copuladoras expertas o separarlas en otro grupo: el de ratas no copuladoras.

5.2 Material y métodos

5.2.1. Protocolo de pruebas de comportamiento sexual

Para realizar el ensayo, los machos son introducidos en una jaula de observación, la que se encuentra en oscuridad (bajo luz roja), donde permanecerán por un período de

5 min para lograr su adaptación. Después de esto, se introduce una hembra receptiva y se registra, a lo largo de 20 min, el comportamiento sexual.

La receptividad de la hembra es inducida previamente por la inyección subcutánea de benzoato de estradiol (4 µg/rata), seguida 44 h más tarde, por la inyección de 2 mg/animal de progesterona. Todas las observaciones de comportamiento se realizan 4 h después de esta última administración.

Los parámetros de comportamiento sexual a analizar son:

Latencia de monta (LM): tiempo que transcurre desde la introducción de la hembra en la jaula hasta que se observa la primera monta.

Latencia de intromisión (LI): tiempo transcurrido desde introducción de la hembra hasta la primera intromisión.

Latencia de eyaculación (LE): tiempo mediado entre la primera intromisión y la eyaculación.

Periodo post eyaculatorio (PPE): tiempo cumplido desde la eyaculación y la próxima intromisión, lo que da comienzo a la siguiente serie copulatoria.

Por otra parte, se registran también, el **Número de montas (NM)** y el **Número de intromisiones (NI)** que ocurren a lo largo de una serie copulatoria.

5.2.2. Entrenamiento

Para completar el entrenamiento es necesario realizar, reiteradas pruebas de comportamiento sexual, cada una con una duración de 20 min. Así, los machos que eyaculen en un tiempo igual o inferior a los 20 min, en al menos las últimas cinco sesiones consecutivas, son considerados "machos sexualmente expertos", mientras que, las ratas macho que no pudieron mostrar actividad sexual son clasificadas como "no copuladoras".

Una vez entrenados y seleccionados los animales, se comienza el ensayo bajo las mismas condiciones en que se realizan los entrenamientos.

5.2.3. Animales

Se utilizan ratas Wistar de una edad promedio de 75-85 días, tanto machos como hembras, ya que es la edad a la cual se encuentran sexualmente maduros (Hull y Rodríguez-

Manzo, 2017). Los machos tienen un peso corporal de 300 ± 50 g a esa edad y las hembras, de 155 ± 15 g. La receptividad de las hembras se asegura en el momento del experimento como se expuso en el protocolo.

Todos los animales son alojados en grupos (4 ratas por jaula) en un ciclo invertido Luz/Oscuridad 12:12 h, a 22 °C y con libre acceso a comida y agua.

Los protocolos de trabajo fueron sometidos a evaluación, así el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (México) aprobó todos los procedimientos experimentales, los que obedecen a las regulaciones establecidas en la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de los animales de laboratorio "NOM-062-ZOO-1999". A su vez, dado que los ensayos fueron realizados en ambos países, también fueron aprobados por el Comité de Ética de protocolos experimentales en los animales utilizados para proyectos científicos, por Res. Decanal 752/2014, Facultad de Ciencias Químicas – UNC, Córdoba (Argentina). Ambos comités actúan de conformidad con los principios internacionalmente aceptados para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

En todos los casos, los animales del grupo control recibieron por vía oral solución salina y los animales del control positivo recibieron como sustancia de referencia 10 mg/kg de sildenafil citrato.

Para la administración por vía oral se utilizó una sonda gástrica de modo de asegurar que las sustancias fueran completa y correctamente administradas.

5.2.4. Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron analizados en primera medida para determinar si la varianza cumplía con la suposición de homocedasticidad. Así, cuando se observó una distribución normal, los datos fueron analizados con tests paramétricos (animales expertos copuladores). En todos los casos donde se analizaron más de dos grupos experimentales se realizaron test de ANOVA de una vía. Cuando se analizaron sólo dos grupos experimentales se utilizó la prueba t.

Cuando la varianza no cumplía con la suposición mencionada, los datos se analizaron con el test no paramétrico Kruskal-Wallis (animales no copuladores). A posteriori se utilizó el test de Bonferroni, en el caso de datos paramétricos o Dunn cuando fueron no paramétricos.

Las LM y LI son expresadas en segundos, mientras que la LE y el PPE se expresan en min.

Las proporciones de animales copuladores se analizan mediante el uso de tablas de contingencia para la prueba F de Fisher y se expresan en porcentajes.

En todos los casos un $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Para los análisis se utiliza el programa GraphPad InStat o Sigma Stat (versión 2.03) y los gráficos son realizados en el programa Excel.

5.3. Experimentación

5.3.1. Experimento 1: Efecto de la decocción de *Phlegmariurus saururus* sobre la conducta sexual de las ratas macho, sexualmente expertas

La evaluación de la actividad sexual de los machos copuladores, permite contemplar distintos componentes del comportamiento sexual (Beach y Jordan, 1956; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009), por lo que este experimento fue diseñado con el fin de establecer el efecto de la decocción de *P. saururus* sobre la motivación y el rendimiento de la rata macho.

Para seleccionar las concentraciones a ensayar se tuvo en cuenta que la etnomedicina informa que las personas usan la planta de la siguiente manera: hierven tres "colitas", o sea 3 tallos de *P. saururus* (alrededor de 3 g) en aproximadamente 250 mL de agua. También se consideró que la gente bebe tres de estos cocimientos por día.

Por otra parte, en el capítulo 3 de Química, se demostró que la decocción tiene un rendimiento de 12 – 13,14 %, por lo que entonces las personas consumen alrededor de 10 mg/kg de decocción al día. Si bien no se puede extrapolar la dosis humana a las ratas, se seleccionaron para el ensayo concentraciones por encima y por debajo de esta cantidad.

Así, para evaluar el comportamiento sexual, las ratas sexualmente expertas fueron divididas en 6 grupos de 6 - 7 animales cada uno. El grupo control conformado por animales sexualmente expertos, fue administrado con solución salina (C_{SE}), el grupo control positivo recibió 10 mg/kg de sildenafil y los grupos tratamiento fueron administrados con

1, 3, 10 y 30 mg/kg de decocción de *P. saururus*. En todos los casos, los animales fueron ensayados 30 min después de ser administrados por vía oral.

5.3.1.1. Resultados

El análisis de los diferentes parámetros del comportamiento sexual de la rata macho reveló que el NM ($F_{(5,36)}: 1,013; p>0,05$; Fig. 5.1.B), la LI ($F_{(5,37)}: 2,196; p>0,05$; Fig. 5.1.C) y el PPE ($F_{(5,37)}: 0,199; p>0,05$; Fig. 5.1.F) no se vieron afectados por la administración de la decocción, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos tratamiento y el control de ratas sexualmente expertas (C_{SE}). Similares resultados fueron obtenidos con el compuesto de referencia.

En relación al NI y la LE, la decocción promovió una disminución estadísticamente significativa en estos parámetros en comparación con el C_{SE} , ($F_{(5,37)}: 4,500$ y $F_{(5,37)}: 8,039$ respectivamente). Así, comparado a los animales control, las intromisiones fueron significativamente disminuidas ($p<0.05$) luego de la administración de la decocción, a casi todas las concentraciones (excepto la menor), como se muestra en la Fig. 5.1.D. Este resultado, demuestra que la decocción de *P. saururus* promueve un mejor rendimiento sexual ya que, incluso con un número de intromisiones significativamente menor que el de los animales control, los animales tratados con *P. saururus*, pudieron eyacular más rápido evidenciando un efecto facilitador y una motivación (Hull y Rodríguez Manzo, 2017).

Además, observado la Figura 5.1.D se puede decir que la decocción de *P. saururus* produjo un efecto motivador en ratas expertas copuladoras y que este efecto no fue evidenciado cuando se usó sildenafil. La Fig.5.1.E muestra la curva dosis respuesta para el parámetro LE. Es importante tener en cuenta que este parámetro está relacionado al rendimiento sexual de la rata macho y es la variable más importante en conducta, reflejando una mejor ejecución sexual del animal a medida que la latencia se reduce en el tiempo. Particularmente, el análisis estadístico reveló que la decocción de *P. saururus* produjo una disminución significativa en la latencia de eyaculación, sin dependencia de concentración. Además, la decocción de *P. saururus* exhibió un efecto comparable al de sildenafil. Sin embargo, es importante resaltar este resultado sabiendo que la decocción es una mezcla de numerosos compuestos, administrada en una concentración similar a aquella de sildenafil, el cual es un compuesto aislado puro. También se debe enfatizar que si bien la decocción actúa en forma similar a sildenafil cuando se evalúa el rendimiento sexual, no sucede lo

mismo cuando valoramos la motivación (reflejado en la disminución del NI). Así, la decocción de *P. saururus* aumenta la motivación de las ratas expertas copuladoras mientras que sildenafil (el compuesto de referencia) no modifica este parámetro.

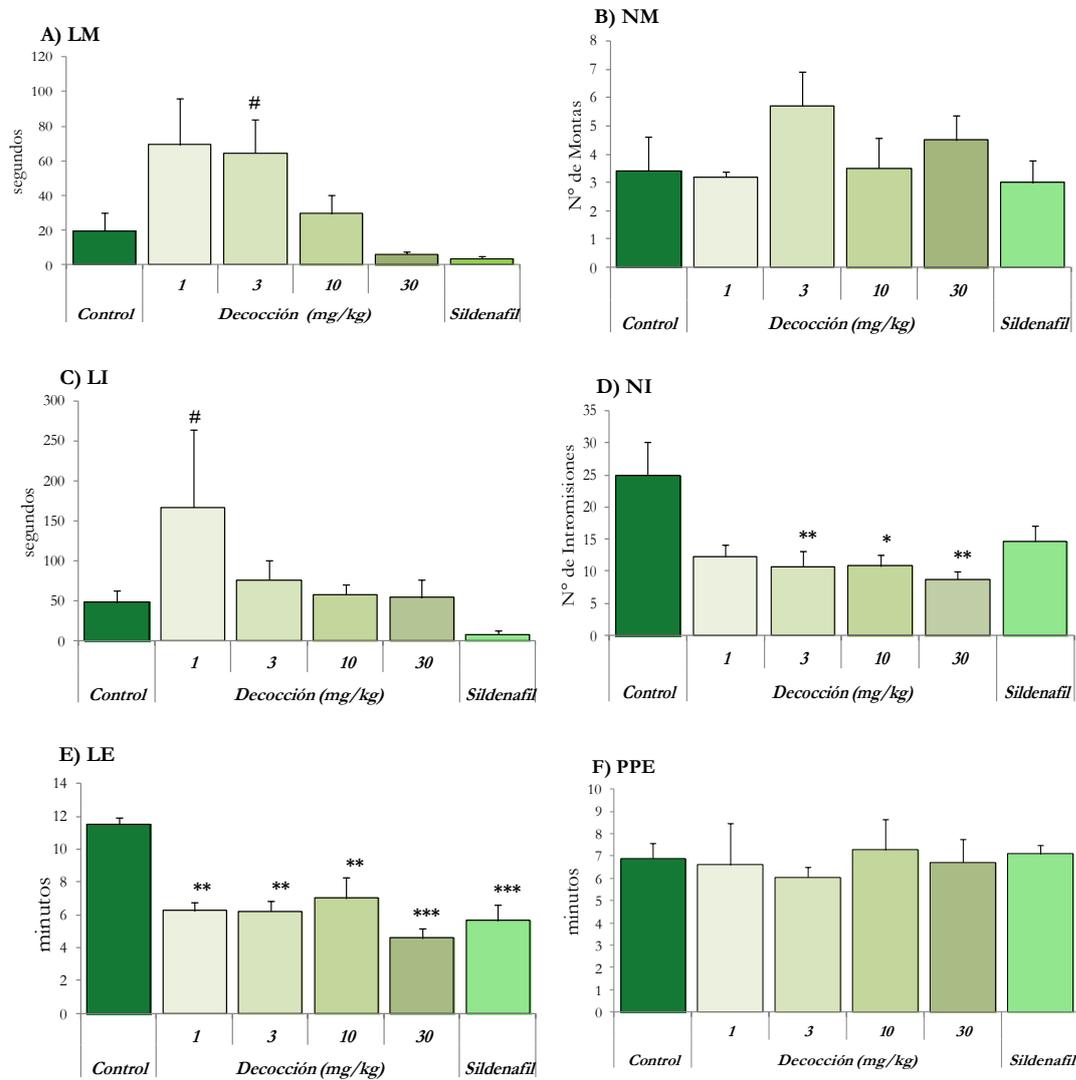


Figura 5.1. Comportamiento sexual de ratas macho sexualmente expertas tratadas con decocción de *P. saururus* en relación al Control y el sildenafil (Control positivo). **A)** Latencia de monta (LM), **B)** Número de montas (NM), **C)** Latencia de intromisión (LI), **D)** Número de intromisiones (NI), **E)** Latencia de eyaculación (LE), **F)** Periodo posteyaculatorio (PPE). Los resultados analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni, se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; * vs. Control. # $p < 0,05$; # vs. sildenafil

5.3.1.2. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la decocción de *P. saururus* mejora la ejecución sexual de la rata macho experta copuladora.

En particular, se destaca la importancia del efecto de la decocción de *P. saururus* que no sólo hace que los animales eyaculen antes (efecto considerado como facilitador), sino que, con un menor número de intromisiones las ratas logran eyacular con una latencia reducida. Esta característica de disminución del NI y la LE es indicio de un deseo sexual incrementado, y por lo tanto de la motivación.

Al mismo tiempo, se evidencia un efecto más potente que sildenafil, ya que, hay que remarcar que la decocción es una mezcla compleja de varios y diferentes compuestos y es efectiva aún a una dosis de 1 mg/kg, mientras que el sildenafil es un compuesto puro (Birri y col., 2017).

5.3.2. Experimento 2: Efecto de la decocción de *Phlegmarius saururus* sobre la conducta sexual de las ratas macho no copuladoras

Como se mencionó anteriormente, cuando se experimenta con animales expertos copuladores se busca evaluar la motivación y el rendimiento de la rata macho. Cuando se usan animales no copuladores, lo que se procura evaluar es la estimulación sexual o deseo sexual (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2013). Dado que se demostró que la decocción de *P. saururus* aumenta la motivación y mejora el comportamiento sexual, nos preguntamos si también promovería el deseo sexual en ratas no copuladoras.

Es por esto que se desarrolló el experimento que se describe a continuación. En primer lugar, hubo que seleccionar ratas no copuladoras, para ello se procedió tal como se describió en el protocolo de comportamiento sexual (Cap. 5. pág. 81). Las ratas macho sexualmente inactivas que fallaron en mostrar actividad sexual en cinco ensayos experimentales consecutivos fueron clasificadas como ratas macho no copuladoras y éstas fueron seleccionadas. A continuación, se siguió el mismo protocolo que fue usado para las ratas sexualmente expertas.

Las ratas no copuladoras fueron divididas en 3 grupos de 6 animales cada uno. El primer grupo fue considerado el grupo control (C_{NC}) y recibió solución salina. El segundo se utilizó como control positivo (S_{NC}) y se trató con 10 mg/kg de sildenafil citrato y el tercer grupo (el grupo tratamiento) recibió 3 mg/kg de la decocción de *P. saururus*. Se decidió utilizar esta dosis, por ser intermedia entre las administradas en el ensayo en ratas sexualmente expertas, y a la vez fue efectiva. Como para las ratas sexualmente expertas, las no copuladoras fueron administradas oralmente mediante sonda gástrica y los experimentos de conducta sexual se realizaron 30 min después de la administración.

5.3.2.1. Resultados

En todos los casos, los animales del grupo control no copuladores (C_{NC}) tratados con solución fisiológica no desarrollaron comportamiento sexual alguno. Por su parte, el 100 % de los animales no copuladores tratados con una única dosis de decocción, realizaron montas e intromisiones, demostrando con ello, que fueron estimulados sexualmente. Al compararlos con el C_{NC} , se encontró una diferencia estadísticamente significativa (OR: 0,006; p: 0,0022).

Además, el 83,3 % de los animales no copuladores tratados con decocción, pudo completar la serie copulatoria antes de los 20 min, logrando eyacular y reiniciar una nueva serie, tal como se comporta una rata sexualmente experta. En comparación con el grupo C_{NC} , nuevamente se observaron diferencias significativas (OR: 0,002; p: 0,0021).

En relación al control positivo se observó que el 50 % de las ratas macho tratadas con sildenafil ejecutaron montas e intromisiones, sin diferencias significativas con el C_{NC} (OR: 0,077; p: 0,1818).

Sólo el 25 % de las ratas macho tratadas con sildenafil completó el comportamiento eyaculatorio y reasumió la serie copulatoria, sin demostrar diferencias significativas con el C_{NC} (OR: 0,1385; p: 0,4545).

Para realizar el análisis de los distintos parámetros relacionados con la serie copulatoria se decidió agregar un control adicional de ratas sexualmente expertas (C_{SE}) administradas con solución salina dado que el control no copulador no produce ningún tipo de comportamiento sexual.

En la Tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los distintos parámetros. Los machos no copuladores del grupo tratamiento no presentaron diferencias estadísticamente significativas con los animales expertos del grupo control (KW_{LM} : 2,849;

KW_{LI} : 3,635; KW_{LE} : 4,370, KW_{PPE} : 5,773; $p > 0,05$), para la mayoría de los parámetros analizados.

Sin embargo, para el NM y el NI sí se observaron diferencias significativas (KW_{NI} : 19,403; KW_{NM} : 19,299; $p < 0,05$). Ambos parámetros mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando fueron comparadas con el C_{NC} .

Estos resultados muestran que los machos no copuladores bajo la influencia de la decocción de *P. saururus*, presentan un comportamiento sexual similar a los animales sexualmente expertos, debido a un incremento del deseo sexual provocado por la decocción.

Así, *P. saururus* mostró un mejor rendimiento y un incremento en el deseo sexual (por lo tanto, en la motivación), ya que logró que los machos no copuladores puedan eyacular, e incluso en el mismo tiempo que lo hace un animal sexualmente experto. Estos resultados sugieren que, 3 mg/kg de decocción de *P. saururus* hacen que las ratas no copuladoras se comporten como copuladoras.

Tabla 5.1. Parámetros específicos de comportamiento sexual de ratas macho no copuladoras tratadas con 3 mg/kg de decocción de *P. saururus*, en comparación con un Control de ratas sexualmente expertas (C_{SE}), Control no copulador (C_{NC}) y con sildenafil (S_{NC}).

Parámetros	Grupos			
	C_{SE}	C_{NC}	S_{NC}	Decocción
LM (s)	7 [5,50 – 13,00]	----	42,5 [9 – 86,25]	17 [9,75 – 73,00]
NM	1 [1 – 6]	0 [0 ± 0]	13 ^{***} [11 – 19]	4 ^{***} [2,25 – 5]
LI (s)	32 [22 – 65]	----	159 [27,5 – 429,5]	12,5 [8,75 – 25,25]
NI	20 [15 – 32]	0 [0 ± 0]	6 [1,75 – 10,25]	11,5 [*] [10 – 15,25]
LE (min)	12,11 [11,26 – 12,19]	----	20,83 [19,59 – 22,05]	16,22 [9,25 – 16,46]
PPE (min)	7,17 [5,43 – 7,61]	----	21,26 [17,52 – 25]	9,16 [6,06 – 9,47]

LM: Latencia de monta, **NM:** Número de montas, **LI:** Latencia de intromisión, **NI:** Número de intromisiones, **LE** Latencia de la eyaculación, **PPE:** Periodo posteyaculatorio. Los resultados fueron analizados por el Test de Kruskal-Wallis y posteriormente con el test de Dunn. Los datos se expresaron como la mediana y el rango intercuartílico ($Q1$ y $Q3$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, * vs. C_{NC} ;

Como consecuencia, todos estos hallazgos apoyan la noción de que la decocción de *P. saururus* no sólo induce la expresión del comportamiento sexual masculino en ratas no copuladoras por aumento del deseo sexual, sino que también promueve una mejor ejecución.

Al ver que la decocción de *P. saururus* permitió que gran parte de las ratas macho no copuladoras logren completar la serie copulatoria y que lo hicieron con un rendimiento similar a las ratas sexualmente expertas, se originaron nuevas preguntas: ¿qué fue lo que había sucedido con estos animales? ¿Sería que en adelante lograrían copular siempre, aun cuando no estuviesen bajo los efectos de *P. saururus*? Los animales no copuladores que consumieron por única vez la decocción de *P. saururus*, ¿fueron convertidos en copuladores?

Para responder a estas preguntas, los animales se sometieron a un período de reposo de 15 días, con agua y alimento *ad libitum* y sin pruebas de comportamiento sexual adicionales. Quince días después que los animales recibieron el tratamiento, a los cuatro grupos se los sometió nuevamente al experimento de comportamiento sexual. El ensayo se repitió el día 16, bajo las mismas condiciones antes descritas, con la excepción de que los machos no fueron nuevamente administrados con la decocción.

Como resultado se observó que el 100 % de las ratas macho que habían sido tratadas con decocción 15 días atrás, realizó montas e intromisiones, y que el 50 % de ellas completó la serie copulatoria (esto es montas, intromisiones, eyaculación y comienzo de una nueva serie con intromisión), confirmando que *P. saururus* fue capaz de transformar las ratas no copuladoras en copuladoras (Fig. 5.2).

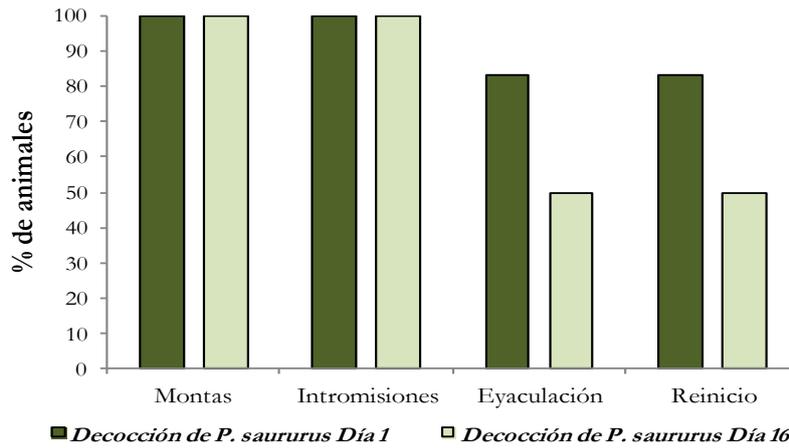


Figura 5.2. Porcentaje de respuesta sexual observada en los animales no copuladores tratados con decocción de *P. saururus* (3 mg/kg, sólo día 1), comparados con la respuesta el día 16.

Hay que destacar que, aunque un 50 % de los machos no lograron eyacular en los 20 min que duró la prueba, todos estaban motivados para copular ya que sí realizaron montas e intromisiones. Basta observar que un animal no copulador, sin ningún tratamiento, no desarrolla este comportamiento (Tabla. 5.2).

Como se puede ver en la Tabla 5.2., el análisis estadístico de los datos demostró que no se presentaron diferencias significativas en el desempeño de los animales cuando se evaluaron todos los parámetros de la serie copulatoria entre los animales no copuladores tratados con decocción, el día 1 y el día 16 sin administración de la decocción (LM, $p = 0,1486$; NM, $p = 0,4362$; LI, $p = 0,5000$; NI, $p = 0,3153$; LE, $p = 0,0714$ y PPE, $p = 0,1964$). Comparando los resultados producidos (para todas las variables) por el sildenafil, entre los días 1 y 16, puede observarse que tampoco se presentaron cambios significativos ($KW_{LM}: 3,89$; $KW_{NM}: 22,401$, $KW_{LI}: 9,158$, $KW_{NI}: 23,137$, $KW_{LE}: 9,537$, $KW_{PPE}: 7,435$; $p > 0,05$).

Estos resultados notables muestran la efectividad del tratamiento con la decocción de *P. saururus* como promotor de la copulación y del deseo sexual. Como se ha dicho, la decocción de *P. saururus* induce el comportamiento sexual a los animales no copuladores y los transforma en copuladores, al menos en los tiempos que dura el estudio.

Un último dato muy interesante es que cuando se compara la LE exhibida por ratas tratadas con decocción, se observó una tendencia a disminuir su valor en el día 16.

Estos resultados sugieren que la decocción hizo que las ratas no copuladoras se comportaran como copuladoras, y que ese efecto persistiera aún 15 días después de haber recibido la decocción de *P. saururus* (Birri y col., 2017).

Tabla 5.2. Parámetros específicos de comportamiento sexual de ratas macho no copuladoras tratadas con 3 mg/kg de decocción de *P. saururus* sólo el día 1 y 15 días posteriores al tratamiento, en comparación con S_{NC} , C_{NC} y C_{SE} .

Parámetros	Tratamientos					
	C_{SE}	C_{NC}	S_{NC}		Decocción <i>P. saururus</i>	
			Día 1	Día 16	Día 1	Día 16
LM (s)	7 [5,50 – 13,0]		42,5 [9 – 86,25]	50 [28,50 – 187]	17 [9,75 – 73,0]	10 [7,5 – 41]
NM	1 [1 – 6]	0– 0	13*** [11 – 19]	7 [4 – 10]	4*** [2,25 – 5]	3 [1 – 7,25]
LI (s)	32 [22 – 65]		159 [27,5 – 429,5]	184 [106,5 – 255]	12,5 [8,75 – 25,2]	12 [9,5 – 19,25]
NI	20 [15 – 32]	0– 0	6 [1,75 – 10,25]	6 [6 – 9]	11,5* [10 – 15,25]	16,5* [9,25 – 19,25]
LE (min)	12,11 [11,2 – 12,1]		20,83 [19,59 – 22,0]	9,04 [8,27 – 10,65]	16,22 [9,25 – 16,4]	5,54 [4,05 – 7,38]
PPE (min)	7,17 [5,43 – 7,61]		21,26 [17,52 – 25]	7,07 [5,51 – 7,41]	9,16 [6,06 – 9,47]	6,11 [4,55 – 6,41]

LM: Latencia de monta, **NM:** Número de montas, **LI:** Latencia de intromisión, **NI:** Número de intromisiones, **LE** Latencia de la eyaculación, **PPE:** Periodo posteyaculatorio.

S_{NC} : grupo sildenafil de ratas no copuladoras, C_{NC} : grupo control de ratas no copuladoras, C_{SE} : grupo control de ratas sexualmente expertas.

Los resultados, analizados por Kruskal-Wallis y posteriormente con el test Dunn, se expresaron como la mediana y el rango intercuartil. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * vs. C_{NC}

5.3.2.2. Conclusiones parciales

Los primeros intentos por convertir animales no copuladores en copuladores se hicieron en la década del '70, varios investigadores lo consiguieron usando un golpe eléctrico, generalmente, en la cola del animal (Sachs, 1976). Posteriormente, se vio que ratas macho no copuladoras pueden ser transformadas en copuladoras después de recibir naloxona o anandamida (Gessa y col., 1979; Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2013).

Varias líneas de investigación, sugieren la participación de opioides endógenos en el estado de inhibición sexual que presentan las ratas macho no copuladoras. Los opioides endógenos y los endocannabinoides son neuromoduladores de liberación de neurotransmisores, aunque a través de diferentes mecanismos (Gessa y col., 1979; Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2013). Es probable que los sistemas opioidérgicos y endocannabinoides pudieran ser, al menos parcialmente, blancos de los compuestos contenidos en la decocción aquí analizada. Se requieren otros enfoques experimentales para elucidar los mecanismos centrales dirigidos por la decocción para convertir permanentemente no copuladores en copuladores.

Se demostró que la decocción de *P. saururus* administrada bajo una única dosis de 3 mg/kg hace que los animales no copuladores logren copular en un 83 % de los casos y despierta el deseo sexual en el 17 % de los animales restantes, lo que hasta este momento nunca había sucedido en estas ratas.

En los reportes que existen en bibliografía se ve que los animales no copuladores que logran copular bajo algún tratamiento, en general no consiguen un rendimiento similar a los copuladores ya que la LE está incrementada (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2013). En el presente experimento, a diferencia de lo anteriormente expresado, la decocción de *P. saururus* mostró valores de LE semejantes a los de los animales sexualmente expertos, logrando que la mitad de los animales complete la serie copulatoria, aún 15 días posteriores al tratamiento.

Con todo esto, podemos concluir que, la decocción de *P. saururus* despierta motivación sexual de los animales no copuladores, activa la serie copulatoria y genera un efecto duradero en el tiempo. Estos resultados indican que, los animales no copuladores adquirieron conductas copulatorias luego de la administración de *P. saururus*, y

mantuvieron la condición de copuladores expertos al menos, durante 15 días luego del tratamiento.

5.3.3. Experimento 3: Efecto de la decocción de *Phlegmariurus saururus* sobre la conducta sexual de ratas macho adultas mayores

De acuerdo a los excelentes resultados obtenidos con la decocción en animales jóvenes tanto copuladores como no copuladores, se decidió estudiar qué pasaría si animales de mayor edad fuesen evaluados en conducta sexual bajo la administración de *P. saururus*, teniendo en cuenta que, al igual que en el hombre, el desempeño sexual de la rata macho decae al aumentar la edad (Hull y Rodríguez Manzo, 2009).

Para responder a nuestro interrogante, a diferencia de los estudios anteriores, se utilizaron ratas Wistar macho de 210 días. Se trabajó con un modelo pareado en el cual, un grupo de 5 ratas fueron administradas el día 0 con solución fisiológica por vía i.p. y posteriormente, ensayadas en conducta sexual. Se las dejó descansar dos días, y se les administraron durante 5 días consecutivos, 10 mg/kg de decocción de *P. saururus*. Los días 1, 3 y 5 del tratamiento, las ratas fueron ensayadas en conducta sexual, tal como se describió al comienzo del capítulo.

5.3.3.1. Resultados

De todos los parámetros de la serie copulatoria evaluados, por la administración a dosis repetidas de la decocción, el único que mostró cambios significativos fue la LE al quinto día de tratamiento ($F_{(3,12)}: 36,963, p<0,05$).

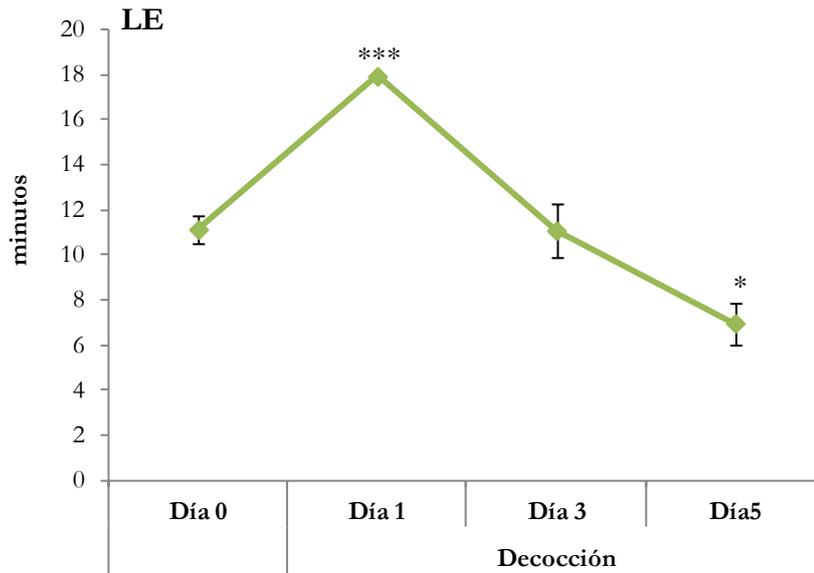


Figura 5.3. Latencia eyaculatoria (LE) de ratas macho sexualmente expertas el día 0 y los días 1, 3 y 5 del tratamiento con decocción de *P. saururus*. Los resultados analizados con ANOVA para medidas repetidas, seguido del test de Bonferroni, se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; * vs. Día 0.

Así, cuando se analizó la LE se observó que los animales adultos mayores tratados con decocción de *P. saururus* lograron disminuir el tiempo que tardan en eyacular, el quinto día del tratamiento.

Este resultado es muy importante ya que habla de un claro efecto prosexual de la decocción de *P. saururus*, cuando es administrada a dosis repetidas en ratas macho adultas mayores.

5.3.3.2. Conclusiones parciales

El envejecimiento se asocia con cambios en la función sexual masculina. Así, la probabilidad de iniciar la copulación disminuye y en el caso que se produzca la cópula, se observan latencias de monta, intromisión y eyaculación aumentadas (Hull y Rodríguez-Manzo, 2009).

Como se pudo ver en los resultados, la decocción de *P. saururus* mejoraría el rendimiento sexual de los machos mejoren su rendimiento sexual aún durante su

envejecimiento, facilitando la respuesta eyaculatoria. Sería muy interesante desarrollar estos experimentos por un período de tiempo más prolongado a fin de evaluar por cuánto tiempo se produce el efecto aquí mostrado.

5.3.4. Experimento 4: Efecto del extracto etanólico de *Phlegmariurus saururus* sobre la conducta sexual de la rata macho

Ya que se encontraron resultados tan importantes con la decocción de *P. saururus*, y de acuerdo con los objetivos planteados oportunamente, se decidió estudiar un extracto más purificado en relación al acuoso, pero que continúe siendo de naturaleza polar, de modo que pudiera contener, gran parte de los metabolitos secundarios que podrían ser responsables de los efectos observados cuando se administró la decocción. Recordando siempre que la etnomedicina explica que las poblaciones consumen extractos acuosos, particularmente en el caso de esta planta y que ellos son de naturaleza polar, se procuró estudiar extractos polares donde estén contenidos ese tipo de compuestos. Por ello la selección recayó sobre un extracto etanólico. La obtención del mismo se explicó en el capítulo 3.

Para la experimentación, se trabajó con 5 grupos de 6 ratas Wistar macho cada uno y sexualmente expertas. El grupo 1 recibió solución fisiológica (control), el segundo grupo fue administrado con 10 mg/kg de sildenafil (control positivo) y los 3 grupos tratamiento recibieron 1, 3 y 10 mg/kg del extracto etanólico de *P. saururus*. A fin de evitar administrar etanol a los animales, el extracto fue evaporado a sequedad y retomado con agua, para posteriormente ser administrado. Todas las administraciones se hicieron por vía oral y pasados 30 min se comenzó el ensayo.

5.3.4.1. Resultados

Las Fig. 5.4.B y 5.4.F muestran que no hubo cambios en el NM ($F_{(4,23)}: 1,297$) ni en el PPE ($F_{(4,22)}: 1,051$). En relación a la LM, fue estadísticamente afectada por el extracto etanólico cuando se administraron, tanto 1 como 10 mg/kg ($F_{(4,22)}: 4,392$; $p < 0,05$), (Fig.

5.4.A), mostrando un pronunciado incremento, en relación al control y sin diferencia significativa para la dosis de 3 mg/kg de decocción, respecto del control así como de sildenafil. Algo semejante ocurre cuando se analiza la LI ($F_{(4,23)}: 6,038$). Con relación al NI se produjo una disminución significativa para las concentraciones de 3 y 10 mg/kg del extracto etanólico en relación al control ($F_{(4,23)}: 5,669$; $p < 0,05$), (Fig. 5.4.D). En cuanto a la LE, como se observa en la Figura 5.4.E, el análisis estadístico reveló que el extracto administrado a 3 y 10 mg/kg produce una disminución estadísticamente significativa en el tiempo que demoran los animales en eyacular (LE) cuando son comparados con el control, exhibiendo un efecto comparable a sildenafil ($F_{(4,21)}: 11,181$; $p < 0,05$).

Es notable cómo aun cuando el NI fue reducido, la LE a esas mismas concentraciones mostró una disminución. La combinación de ambos resultados permitiría inferir que el extracto etanólico a esas concentraciones provoca motivación (que no es observada para sildenafil, dado que el NI es semejante al del control) y mejora el rendimiento en el comportamiento sexual de la rata macho sexualmente experta.

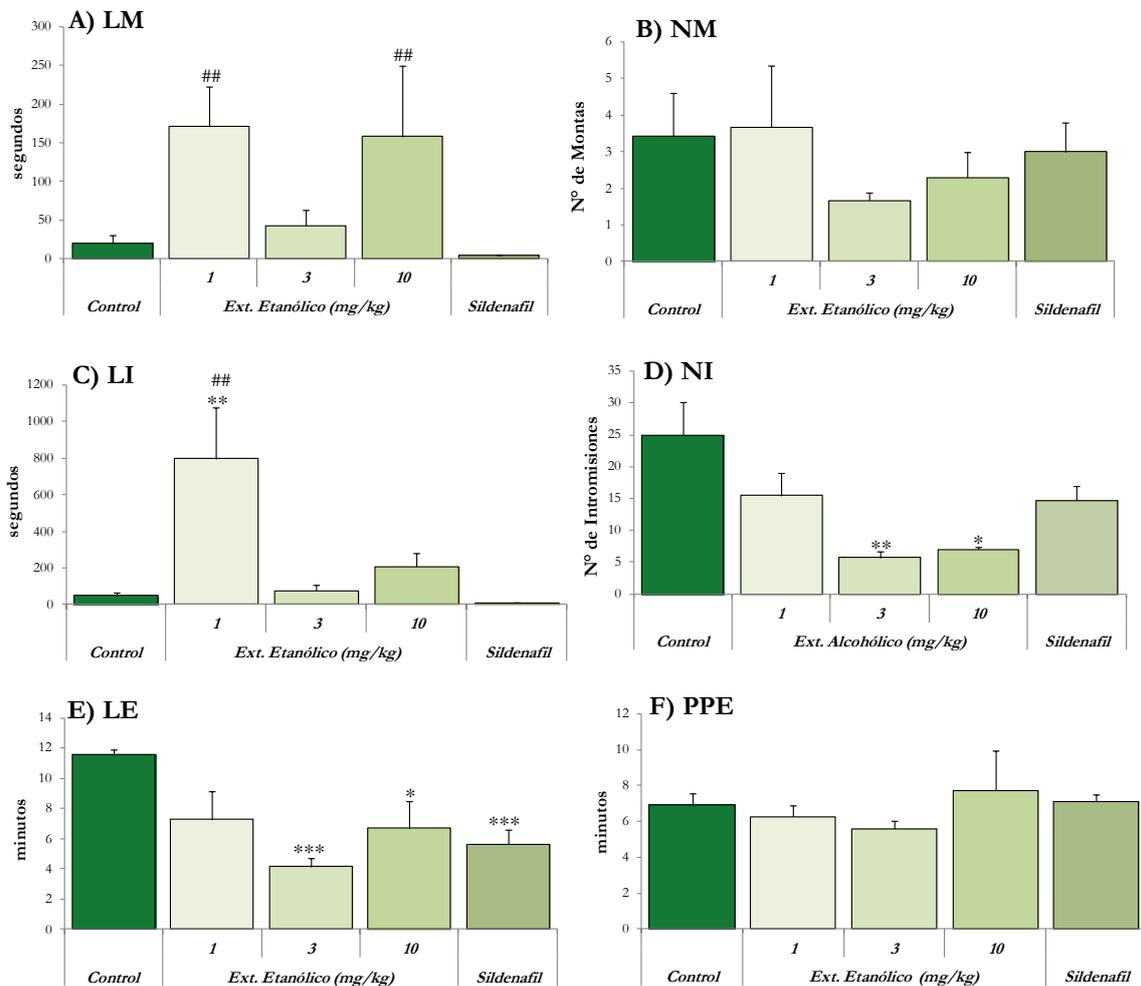


Figura 5.4. Comparación de los parámetros específicos del comportamiento sexual de las ratas macho tratadas con extracto etanólico de *P. saururus* en relación al Control y el sildenafil. **A)** Latencia de monta, **B)** Número de montas, **C)** Latencia de intromisión, **D)** Número de intromisiones, **E)** Latencia de la eyaculación, **F)** Periodo posteyaculatorio. Los resultados analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni, se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; * vs. Control. ## $p < 0,01$; # vs. sildenafil.

5.3.4.2. Conclusiones parciales

El extracto etanólico de *P. saururus* aquí evaluado, mejora el rendimiento sexual de la rata macho sexualmente experta.

Facilita la conducta sexual, permitiendo que los animales eyaculen antes y que logren hacerlo, aun con un menor número de intromisiones que el grupo control.

El control positivo por su parte, facilita también la conducta sexual pero no parece producir motivación ya que no afecta el número de intromisiones, como sí lo hace el E. etanólico a 3 y 10 mg/kg, cuyo NI se ve significativamente disminuido.

5.3.5. Experimento 5: Efecto del extracto alcaloidal de *Phlegmariurus saururus* sobre la conducta sexual de la rata macho

Para continuar estudiando el efecto afrodisíaco de *P. saururus* se decidió estudiar la familia de metabolitos secundarios más importantes que se encuentran tanto en la decocción como en el extracto etanólico: los alcaloides. Hay que recordar que existen antecedentes en nuestro grupo de investigación que demuestran que el extracto alcaloidal y algunos de los alcaloides aislados tienen la capacidad de inhibir a la enzima Acetilcolinesterasa (Ortega y col., 2004a; 2004b), y que la Acetilcolina es un neurotransmisor que participa en la intermediario en la producción de NO y por lo tanto, en el proceso de erección.

De acuerdo a los resultados previos mostrados en este capítulo, sería esperable que el extracto alcaloidal diese resultados semejantes. Por lo tanto fue objetivo del presente experimento, evaluar si el extracto alcaloidal de *P. saururus* tiene efecto sobre la conducta sexual de la rata macho sexualmente experta.

Para ello, ratas Wistar macho sexualmente expertas fueron administradas con solución fisiológica (control), 10 mg/kg de sildenafil (control positivo) o extracto alcaloidal de *P. saururus* en dosis de 0,005; 0,05; 0,5 y 2 mg/kg (tratamientos).

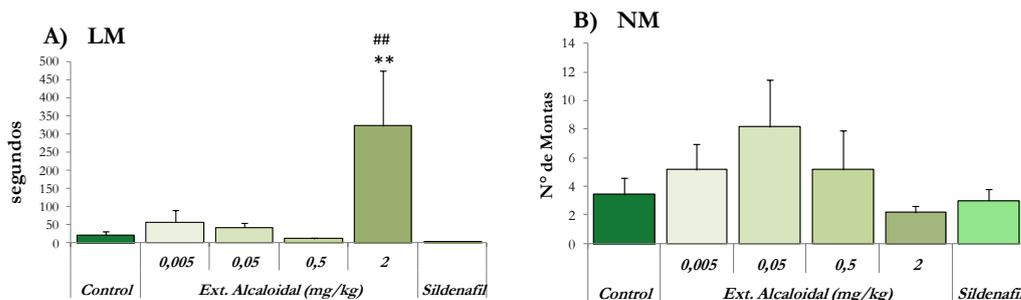
Todos los grupos estaban compuestos de 6 – 7 animales y pasados 30 min de ser oralmente administrados mediante una cánula, se comenzó el ensayo.

5.3.5.1. Resultados

El análisis de los datos obtenidos mostró que el extracto alcaloidal de *P. saururus* disminuye el tiempo que los animales tardan en eyacular (LE) en relación a los animales del grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa para las dosis de 0,05, 0,5 y 2 mg/kg ($F_{(5,32)}$: 9,442; $p < 0,05$), (Fig. 5.5.E). La disminución de la LE observada en la Figura 5.5.E para el extracto alcaloidal, es estadísticamente similar a la observada para los animales tratados con sildenafil ($p > 0,05$).

Se puede agregar también que el extracto alcaloidal a 2 mg/kg mostró un aumento significativo en relación al control y al sildenafil para la LM ($F_{(5,28)}$: 4,446; $p < 0,05$).

Si bien para el resto de los parámetros no se evidenciaron diferencias significativas con el control ($F_{(5,32)}^{NM}$: 1,236; $F_{(5,32)}^{LI}$: 2,863, $F_{(5,32)}^{NI}$: 1,010, $F_{(5,32)}^{LE}$: 1,725; $p > 0,05$), el efecto observado en la LE es muy importante ya que demuestra la facilitación que produce *P. saururus* en los machos en su conducta sexual.



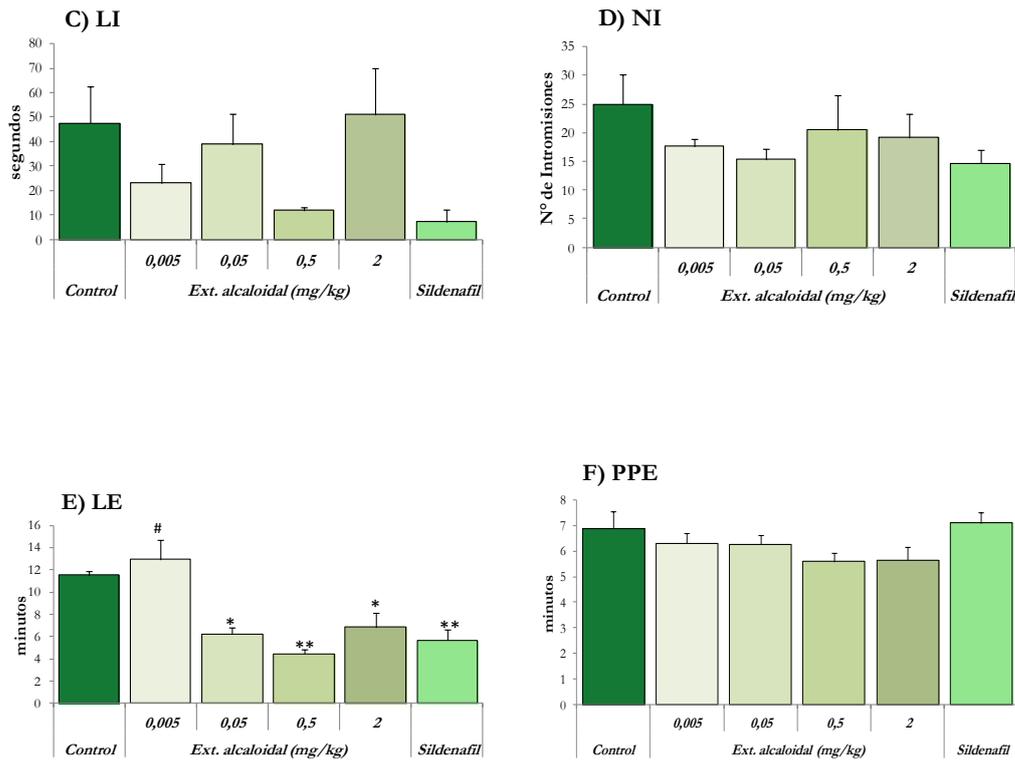


Figura 5.5. Comparación de los parámetros específicos del comportamiento sexual de ratas macho tratadas con extracto alcaloidal de *P. saururus*, en relación al Control y el sildenafil (Control positivo). **A)** Latencia de monta (LM), **B)** Número de montas (NM), **C)** Latencia de intromisión (LI), **D)** Número de intromisiones (NI), **E)** Latencia de la eyacuación (LE), **F)** Periodo posteyaculatorio (PPE). Los resultados analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni, se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * vs. Control. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; # vs. sildenafil

5.3.5.2. Conclusiones parciales

En concordancia con lo esperado, el extracto alcaloidal de *P. saururus*, también mejora el rendimiento sexual, actuando como afrodisíaco.

El extracto alcaloidal de *P. saururus* no ha producido un cambio en la motivación de los animales, a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Con estos resultados se podría inferir que serían los alcaloides los responsables, al menos parcialmente, de los efectos afrodisíacos (mejor rendimiento sexual) por los cuales

P. saururus es ampliamente utilizada en medicina popular, dada la disminución significativa producida en dos de las concentraciones ensayadas.

Estos resultados sugerirían que los alcaloides no estarían involucrados en el aumento de la motivación de las ratas expertas copuladoras, observada cuando fueron administradas con los extractos anteriormente ensayados.

5.3.6. Experimento 6: Efecto de sauroxina sobre la conducta sexual de las ratas macho, sexualmente expertas

Los resultados obtenidos hasta aquí en las investigaciones desarrolladas sobre conducta sexual utilizando animales copuladores, fueron exitosos tanto con la decocción, el extracto etanólico y posteriormente con el extracto alcaloidal. El análisis retrospectivo indicaría que serían los alcaloides, los responsables del efecto facilitador sobre la conducta sexual dado que estos son solubles en agua al estado de sales (como se los encuentra en la planta) y por lo tanto están presentes en la decocción. Al mismo tiempo, son también solubles en alcohol y, de hecho, forman el extracto alcaloidal, ya que para obtener este extracto se realizó una extracción alcalina específica para esta familia de metabolitos secundarios (ver Cap. 3).

Hasta el presente, 10 alcaloides, del tipo *Lycopodium*, han sido identificados en el extracto alcaloidal de *P. saururus*. De estos alcaloides, sauroína, sauroxina y 6-hidroxicopodina son los que se encuentran en mayor concentración (definidos como mayoritarios), mientras que los demás aparecen en concentraciones muy bajas, inclusive algunos a nivel de trazas (Ortega y col., 2004 a; 2004 b; 2007; Vallejo y col., 2013).

Sauroxina es un alcaloide que fue identificado por primera vez en *Lycopodium saururus* (actualmente *P. saururus*) por Ayer y col., en 1965. Forma parte del grupo de alcaloides que se encuentran en mayor proporción en el extracto alcaloidal de *P. saururus*.

Con respecto a su actividad biológica, se conoce que al igual que el extracto alcaloidal, inhibe la enzima AchE, por lo que tiene efecto colinérgico (Puiatti y col., 2013).

Teniendo en cuenta el objetivo de evaluar el efecto de los alcaloides mayoritarios sobre la conducta sexual, se comenzó con el alcaloide sauroxina. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de sauroxina sobre la conducta sexual de la rata Wistar macho sexualmente experta y asignar o descartar su posible efecto prosexual.

Para ello, grupos de 7 ratas sexualmente expertas fueron ensayadas en un modelo pareado (cada animal fue su propio control). El primer día se les administró por vía oral mediante una cánula, solución fisiológica y así fueron ensayadas como control. Al día siguiente, recibieron el tratamiento y entonces los animales fueron administrados con 1, 10 ó 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sauroxina. Un cuarto grupo recibió 10 mg/kg de sildenafil, para ser considerado como control positivo.

5.3.6.1. Resultados

Cuando se analizó el desempeño sexual de los animales, antes y después de recibir el tratamiento con sauroxina, se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos para casi ninguno de los parámetros analizados (datos no mostrados), con excepción de la LE, la cual disminuyó significativamente cuando se administraron las dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (t_4 : 2,978; $p < 0.05$), y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente (t_4 : 2,646; $p < 0.05$), (Fig. 5.6).

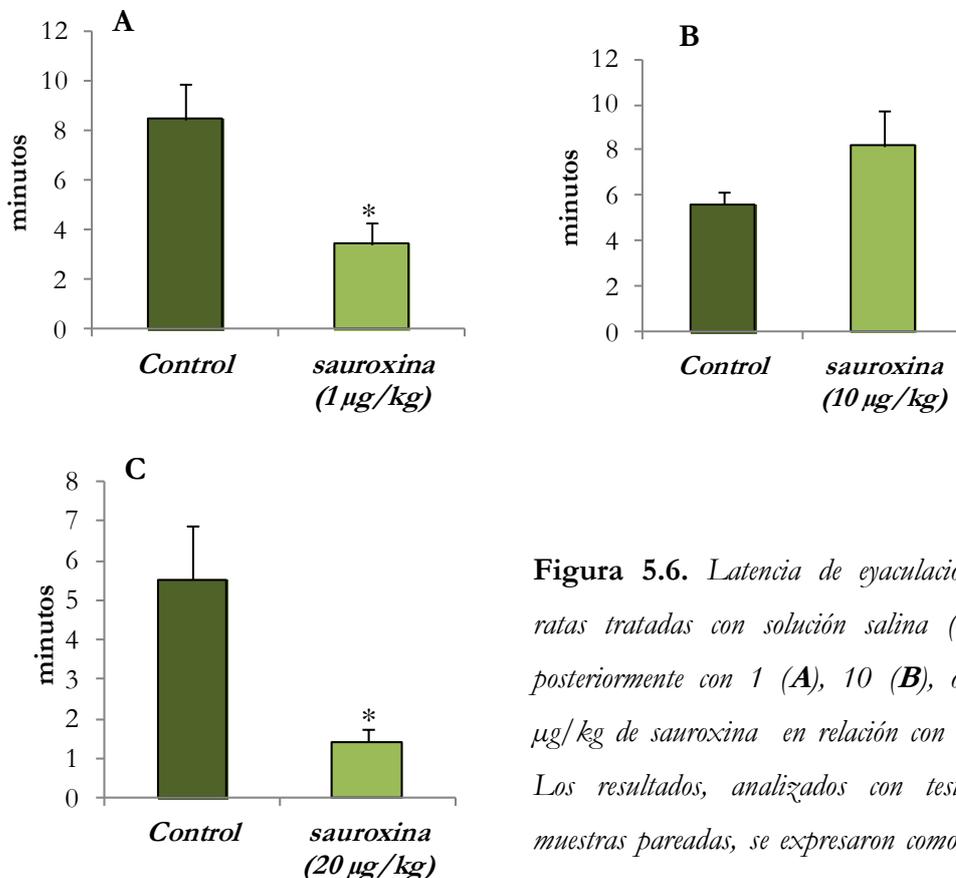


Figura 5.6. Latencia de eyaculación de las ratas tratadas con solución salina (control) y posteriormente con 1 (A), 10 (B), ó 20 (C) $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sauroxina en relación con el control. Los resultados, analizados con test *t* para muestras pareadas, se expresaron como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$.

La Figura 5.7. muestra el efecto producido por sauroxina sobre la LE en relación al provocado por el sildenafil (compuesto de referencia). Como se puede observar, no hay diferencias significativas para las menores dosis estudiadas ($t_{10}^{1\mu\text{g}/\text{kg}}$: 1,602; $t_{12}^{10\mu\text{g}/\text{kg}}$: 0,09; $t_{10}^{\mu\text{g}/\text{kg}}$: 1,602; $p>0,05$), sin embargo, cuando sauroxina se administró a una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, produjo una disminución estadísticamente significativa de la latencia al compararla con la sustancia de referencia ($t_{20}^{\mu\text{g}/\text{kg}}$: 2,695; $p>0,01$).

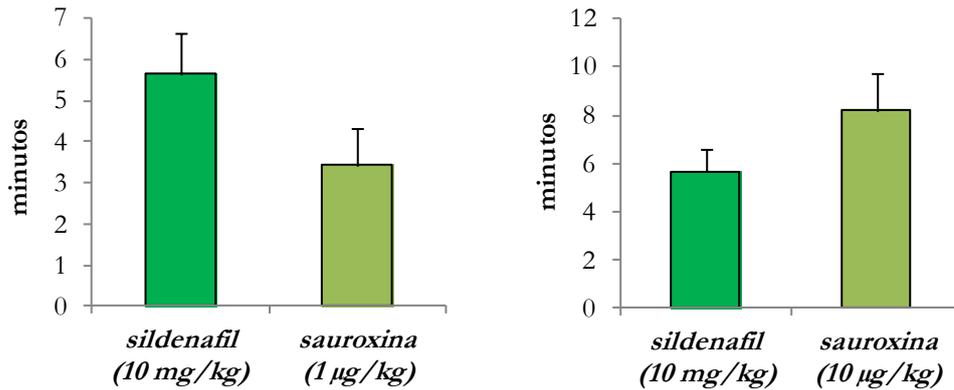
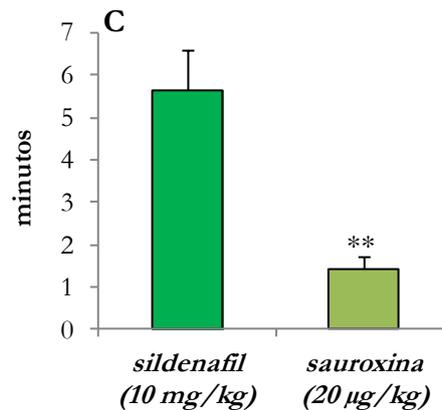


Figura 5.7. Latencia de eyaculación de las ratas tratadas con sauroxina (1, 10 ó 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en relación con sildenafil (10 mg/kg). Los resultados, analizados por prueba t, se expresaron como la media \pm SEM.



5.3.6.2. Conclusiones parciales

Se demostró que sauroxina promueve actividad afrodisíaca basados en la facilitación provocada en la conducta sexual mediante la disminución de la latencia eyaculatoria en comparación con el control.

Relacionado con el control positivo, sauroxina administrada por vía oral a una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, produjo un mejor efecto que sildenafil, el compuesto de referencia.

Por otro lado, sauroxina no elicó un incremento en el deseo sexual en las ratas macho sexualmente expertas, de acuerdo a la ausencia de diferencias significativas en los parámetros relacionados con esta característica.

Es importante evaluar los otros dos alcaloides mayoritarios antes de emitir una conclusión definitiva, ya que hasta el momento sí es posible afirmar que, al menos en parte, sauroxina es responsable por la mejora en la ejecución sexual observada para la decocción, el extracto etanólico y el alcaloidal aquí estudiados, pero no da cuenta del efecto incrementado del deseo sexual elicó en las ratas macho no copuladoras, ni de los efectos motivadores observados entre las ratas sexualmente expertas, cuando fue evaluada la decocción de *P. saururus*.

5.3.7. Experimento 7: Efecto de los alcaloides de *Phlegmariurus saururus* sobre la conducta sexual de las ratas macho no copuladoras

De acuerdo a los resultados obtenidos con sauroxina usando ratas macho sexualmente expertas, y como consecuencia de las conclusiones a las que se arribó cuando se administró la decocción en ratas macho no copuladoras, se propuso como objetivo desarrollar un experimento a fin de determinar si los alcaloides mayoritarios producen efectos semejantes a los obtenidos con la decocción de *P. saururus*.

Específicamente, el propósito del presente experimento fue evaluar el efecto de los alcaloides sauroxina y sauroína sobre la conducta sexual de la rata Wistar macho no copuladora, y de esta manera, determinar si el efecto de reversión en la condición de no copuladores observado con la decocción, es consecuencia de la presencia de algunos de estos alcaloides por incremento del deseo sexual.

Para ello, se trabajó con 7 grupos de 6 animales cada uno, todos formados por ratas no copuladoras. El primer grupo recibió solución fisiológica y los animales fueron ensayados como control, los tres grupos siguientes fueron tratados con 1, 10 ó 20 µg/kg de sauroxina y los últimos 3 grupos, fueron administrados con 1, 10 ó 20 µg/kg de sauroína.

5.3.7.1. Resultados

A diferencia de lo observado con la decocción de *P. saururus*, todos los animales administrados tanto con sauroxina como con sauroína, se comportaron igual que el control no copulador ($p > 0,05$).

Ninguno de los animales desarrolló ninguno de los parámetros de la serie copulatoria, no reaccionando incluso, al cambio de hembra receptiva.

5.3.7.2. Conclusiones parciales

Los resultados aquí encontrados nos indican que los alcaloides sauroxina y sauroína, no fueron efectivos a la dosis ensayadas en animales no copuladores. Se podría inferir que los mecanismos neurales por los cuales es efectiva la decocción de *P. saururus*, no son activados por ninguno de estos alcaloides, al menos a las dosis ensayadas y/o cuando son administrados en forma individual.

Teniendo en cuenta que el uso de animales no copuladores nos permite evaluar el deseo sexual, los resultados aquí encontrados, son congruentes con los obtenidos para animales expertos copuladores, donde se observó que los alcaloides no modifican los parámetros relacionados a la motivación.

Esto nos permite plantear distintas hipótesis, una posibilidad es que otros componentes químicos presentes en la decocción, actúen como agentes coadyuvantes en la producción de los efectos demostrados. Así, la presencia del aminoácido arginina (Vallejo y col., 2013b) podría ser uno de los postulados, dado el importante papel que desempeña en la formación del NO (Uribe Arcila, 2006), así como la presencia de saponinas en la decocción, que si fuesen de núcleo esterooidal, podrían considerarse un factor contribuyente dada su relación con las hormonas esterooidales.

Nuevos experimentos deberán ser desarrollados para comprobar o descartar estas hipótesis.

5.4. Conclusiones

Todos los resultados presentados a lo largo de este capítulo, muestran que *P. saururus* posee actividad afrodisíaca en ratas macho expertas sexualmente.

Se observó que, tanto en los animales tratados con decocción, extracto etanólico, extracto alcaloidal, como así también con el único alcaloide estudiado hasta el presente (sauroxina), se produjo un efecto prosexual, facilitando la ejecución sexual de las ratas macho sexualmente experimentadas.

Con respecto a la motivación, se puede decir que sólo la decocción y el extracto etanólico, modifican este parámetro. Estos resultados sugieren que serían otros componentes, distintos a los alcaloides, los que presentan este efecto, pudiendo mencionar como posibles responsables las saponinas y/o alguno de los aminoácidos presentes en *P. saururus*.

También se ha demostrado, que la decocción tiene efectos facilitatorios cuando es administrada en animales adultos mayores.

P. saururus indujo asimismo el comportamiento copulatorio en ratas macho no copuladoras, e incluso las convirtió en copuladoras. Este efecto de la decocción en animales no copuladores, no fue manifestado cuando los alcaloides aislados sauroxina y sauroína fueron evaluados. Teniendo en cuenta que los alcaloides no modifican la motivación, y por lo tanto tampoco el deseo, y que con los animales no copuladores evaluamos estos parámetros, los resultados aquí obtenidos fueron los esperados.

Todos estos resultados demuestran un marcado efecto afrodisíaco producido por *P. saururus*, confirmando de esta manera, que existe una perfecta correlación entre los resultados obtenidos en las presentes investigaciones y lo proclamado por la etnomedicina.

5.5. Bibliografía

- Ayer, W., Habgood, T., Deulofeu V., Juliani, H., 1965. Lycopodium Alkaloids. Sauroxine. *Tetrahedron*, 21, 2169–2172.
- Beach, F., 1942. Execution of the complete masculine copulatory pattern by sexually receptive female rats. *Pedagog. Semin. J. Genet. Psychol.*, 60 (1), 137-142.
- Beach, F., Jordan, L., 1956. Effects of sexual reinforcement upon the performance of male rats in a straight runway. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 49, 105-110.
- Birri, M., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese M., 2017. Aphrodisiac activity of *Phlegmariurus saururus* in copulating and noncopulating male rats. *Phytomedicine*, 24, 104–110.
- Canseco-Alba, A., Rodríguez-Manzo, G., 2013. Anandamide transforms noncopulating rats into sexually active animals. *J. Sex. Med.*, 10 (3), 686-693.
- Donald, A., 1969. Copulatory Behaviour of rats (*Rattus norvegicus*) as a function of prior copulatory experience. *Anim. Behav.*, 17, 217-223.
- Gessa, G., Paglietti, E., Pellegrini-Quarantotti B., 1979. Induction of copulatory behavior in sexually inactive rats by naloxone. *Science*, 204, 203-204.
- Hull, E. M., Rodríguez-Manzo, G., 2009. Male Sexual Behavior. In: Donald W. Pfaff, Arthur P. Arnold, Anne M. Etgen, Susan E. Fahrbach and Robert T. Rubin, editors. *Hormones, Brain and Behavior*, 2nd Ed, Vol 1. Academic Press. San Diego. EE.UU.
- Hull, E.M., Rodríguez-Manzo, G., 2017. Male Sexual Behavior. In Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier. Ámsterdam. ISBN 9780128093245.
- Sachs, B., Barfield, R., 1976. Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. In: *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press. New York. 7, 91-154.
- Ortega, G., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2004a. Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine*, 11(6), 539–543.
- Ortega, G., Agnese, M., Cabrera, J.L., 2004b. Sauroine—a novel Lycopodium alkaloid from *Huperzia saururus*. *Tetrahedron Lett.*, 45 (38), 7003–7005.
- Ortega, G., Agnese, M., Barboza, G., Cabrera, J.L., 2007. Seasonal study of the alkaloid pattern of *Huperzia saururus* with habitat in Córdoba province (Argentina). *J. Arg. Chem. Soc.*, 95 (1–2), 1–9.

- Puiatti, M., Borioni, J.L., Vallejo, M., Cabrera, J.L., Agnese, M., Ortega G., Pierini, A., 2013. Study of the interaction of *Huperzia saururus* Lycopodium alkaloids with the Acetylcholinesterase enzyme. *J. Mol. Graph. Model.*, 44, 136 – 144.
- Uribe Arcila, J.F., 2006. Una teoría general de la función y la disfunción eréctil. *Urol. Colomb.*, XV (3), 33-45.

Capítulo 6:
Mecanismos
de
Acción



¿Cuál es el mecanismo de acción por el cual actúa *Phlegmariurus saururus*?

6.1. Introducción

Para lograr un eficaz efecto farmacológico, es importante conocer la forma en que una sustancia ejerce su acción sobre el organismo, esto es, dónde actúa y cómo lo hace.

Cuando se hace referencia a la conducta sexual masculina, se sabe que determinados estímulos llegan al Sistema Nervioso Central (SNC) donde se activan vías neurales que envían información desde los centros cerebrales superiores hacia la médula espinal. Al mismo tiempo, el Sistema Nervioso Autónomo activa los órganos genitales para producir la erección peneana. Estos fenómenos desencadenan la liberación de distintos neurotransmisores y neuropéptidos (NO, Serotonina, Noradrenalina, Oxitocina, Acetilcolina y Dopamina, entre otros) que están involucrados, tanto a nivel central como periférico, en el control de las distintas fases del comportamiento sexual (Argiolas y Melis, 2013; Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

En relación a la erección, en líneas generales, podemos decir que el principal mediador es el óxido nítrico (NO). Mientras que, cuando hablamos de eyaculación resalta la participación de serotonina (5-HT), pero como un neurotransmisor inhibitorio.

Como ya se mencionó, el NO es uno de los principales neurotransmisores que actúan en la función sexual. Su acción es la de facilitar la erección ya que actúa como un vasodilatador, pero al mismo tiempo, inhibe la eyaculación (Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

Aunque 5-HT generalmente inhibe el comportamiento sexual masculino, la estimulación de receptores 5-HT_{1A} facilita marcadamente la eyaculación. Como sucede con otros neurotransmisores, tiene un efecto inhibitorio sobre la copulación cuando es liberado en altas concentraciones, mientras que contribuye a la desinhibición en bajas concentraciones (Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

Otro neurotransmisor involucrado en la función sexual masculina es la Noradrenalina o Norepinefrina. Ésta, puede facilitar o inhibir el comportamiento sexual masculino, dependiendo de la dosis y del subtipo de receptor activado. Por un lado, su acción simpática en el pene, promueve la detumescencia, mientras que, el bloqueo de los

receptores $\alpha 2$ o la estimulación de los receptores $\alpha 1$, aumentan la excitación sexual y facilita la eyaculación regulada a nivel espinal (Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

Por otro lado Oxitocina (OT) facilita la función eréctil y el comportamiento sexual masculino, y es un mediador de las contracciones perineales que se producen durante la eyaculación y el orgasmo. Al mismo tiempo, se destaca su posible papel en la excitación y la motivación (Argiolas y Melis, 2013; Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

La Acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor facilitatorio de la eyaculación. Cuando es administrado en animales expertos copuladores, la ACh disminuye la Latencia Eyaculatoria, y la cantidad de montas e intromisiones necesarias para que se produzca la eyaculación (Argiolas y Melis, 2013; Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

Dopamina, es un neurotransmisor que facilita tanto la cópula como la motivación sexual, pero al igual que sucede con otras sustancias, tiene un efecto dosis dependiente. A dosis bajas facilita, mientras que, a dosis altas inhibe la cópula (Argiolas y Melis, 2013; Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

Finalmente, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio, inhibe el comportamiento sexual y se vio que durante el periodo post eyaculatorio (PPE) aumenta su concentración (Argiolas y Melis, 2013; Hull y Rodríguez-Manzo, 2017).

Experimentalmente, la manera por la cual una sustancia actúa, puede ser estudiada mediante distintas técnicas, ya sean *in vitro*, en células o tejidos aislados, *ex vivo*, utilizando células o tejidos de animales previamente expuestos a la sustancia, o *in vivo*, midiendo la respuesta que produce en el animal (Lees y col., 2004).

Dado que se pudo comprobar el efecto prosexual de *P. saururus*, es importante conocer el mecanismo por el cual esta planta produce su efecto. Para ello se estudió la forma en que la decocción de esta especie actúa, utilizando distintas técnicas.

6.2. Experimentación

6.2.1. Experimento 1: Expresión de la enzima eNOS

Es importante conocer el efecto de *P. saururus* sobre la expresión de eNOS, ya que como se explicó en la introducción, es una de las enzimas responsables de la producción de NO. El objetivo del presente ensayo fue evaluar si la decocción de *P. saururus* modificaba la

expresión de la enzima eNOS, en cultivo de células mononucleares obtenida de sangre periférica, por ser considerado un modelo válido para medir la expresión de la enzima eNOS (Jiménez y col., 2001; Mateos-Cáceres y col., 2006).

6.2.1.1. Material y métodos

6.2.1.1.1. Cultivo celular

Para realizar el cultivo celular, se utilizaron células mononucleares humanas obtenidas de sangre periférica (CMSP).

Las CMSP fueron aisladas de sangre periférica humana, tomada de donantes voluntarios sanos (de 30 a 45 años), por centrifugación sobre gradientes de Hystopaque (Sigma Chemical Co., CA).

Las CMSP fueron resuspendidas ($1,1 \times 10^6$ cel/mL), en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), (Gibco Invitrogen/Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF, RPMI-SBF 10 % v/v) y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Gentamicina.

Finalmente, las suspensiones celulares se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos de fondo plano a razón de 400 μL por pocillo (440×10^3 cel) y se incubaron en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2 en aire, a 37 °C.

6.2.1.1.2. Condiciones de cultivo

Luego de 24 h del cultivo, las células fueron tratadas durante 24 ó 48 h con 500, 100 o 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de decocción de *P. saururus*.

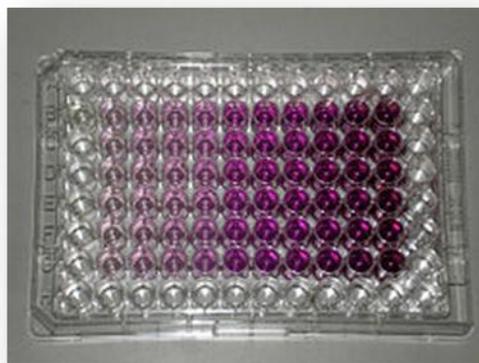
La decocción fue disuelta en medio de cultivo, RPMI-SBF 10 % y el grupo control (C) estuvo conformado por células cultivadas de igual manera, pero sin la decocción.

Al finalizar la incubación, las células fueron recogidas, lisadas y los lisados celulares conservados a -80 °C hasta su utilización.

6.2.1.1.3. Citotoxicidad celular

Para confirmar que la decocción de *P. saururus* no fue tóxica en las condiciones ensayadas se realizó un ensayo de citotoxicidad.

Para realizar la prueba de citotoxicidad celular se utilizó un ensayo colorimétrico empleando Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT). Este ensayo se basa en la reducción metabólica que sufre el MTT (colorante amarillo) cuando ingresa a la células, por causa de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, para formar formazán, un compuesto de color azul. Esta reducción, permite determinar la función mitocondrial, dado que si una célula no se encuentra viable no metabolizaría el MTT y no se produciría el color azul. De este modo, la cantidad de células vivas, es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1983).



Se consideró aceptable una citotoxicidad inferior al 10 %.

6.2.1.1.4. Obtención de extractos proteicos

Extractos proteicos fueron preparados a partir de las células mononucleares, incubadas y estimuladas como se indico en 6.2.1.1.2. Para ello, luego de la incubación se descartó el medio de cultivo de cada pocillo y las placas, mantenidas sobre hielo, fueron lavadas por tres veces consecutivas con PBS enfriado.

Los extractos proteicos se obtuvieron lisando las células sobre hielo con 80 μ L de tampón de lisis RIPA (PBS 1x, Nonidet P40 al 1 % (v/v), desoxicolato de sodio al 0,5 % (p/v), SDS al 0,1 % (p/v) y cóctel inhibidor de proteasas) durante 20 min. Los lisados se sonicaron durante 20 s y se centrifugaron durante 10 min a 10.000 g y a 4 °C para eliminar los restos celulares.

Finalmente, la concentración de proteínas en los sobrenadantes se determinó usando la técnica de Bradford (1976). Mediante esta metodología el colorante, Comassie Blue G-250, se une a las proteínas para formar un complejo coloreado.

Los lisados resultantes se guardaron y se almacenaron a -80 °C para ensayos de Western Blot.

6.2.1.1.5. Western Blot. Electroforesis de proteínas (SDS – PAGE)

Esta técnica separa proteínas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante en presencia de SDS (SDS – PAGE), según el método de Laemli (1970). Las proteínas son identificadas mediante la utilización de anticuerpos específicos.

Los distintos lisados celulares (previamente diluidos con tampón de carga y desnaturizados a 95 °C durante 3 min) fueron sembrados en los respectivos carriles (80 µg/carril) de un gel de poliacrilamida al 8 % (SDS-PAGE).

Como control positivo del anticuerpo se utilizó un lisado proteico de cerebro de rata. Paralelamente, se sembró un carril con un marcador de peso molecular para asegurarnos la mejor identificación de la enzima (Amersham Internacional, UK).

Una vez sembrados los geles, se sometieron a electroforesis a 100 V, utilizando como buffer de corrida una solución conteniendo glicina 192 mM en Tris 25 mM y SDS 0,1 %, pH 8,8.

Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas del gel fueron electrotransferidas con Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM, glicina 25 mM, y metanol 20 %, a membranas de nitrocelulosa (Protran, Schleicher & Schuell, Bioscience, Alemania). Para esto se utilizó el método húmedo manteniéndose constante un voltaje de 100 V (250-350 mA) durante 1 h. Posteriormente las membranas fueron coloreadas con Rojo Ponceau S (0,1 % en ácido acético 5 %) para controlar el proceso de transferencia y la carga proteica.

Las membranas fueron lavadas durante 5 min con solución tampón TBS-T (Tris-HCl 100 mM, NaCl 0,9 %, Tween-20 0,1 %, pH 7,5) y posteriormente incubadas con albumina de suero bovino al 5 % en TBS-T a fin de bloquear los sitios inespecíficos donde se podría unir el anticuerpo. Las membranas se incubaron durante 1 h, a temperatura ambiente.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpo primario anti-eNOS (BD Bioscience, 1-2 µg/mL) diluido en albumina de suero bovino al 5 % en TBS-T o anti-Actina (I-19, Santa Cruz Biotechnology sc-1616) durante toda la noche, a 4°C. Actina fue la proteína seleccionada para lograr, posteriormente, normalizar las señales originadas por la enzima eNOS.

Luego de la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T, por 5 min a temperatura ambiente.

Para detectar la presencia del anticuerpo primario, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario, que se une específicamente al primero, conjugado con peroxidasa de rabanita para permitir su posterior detección.

En el caso del anticuerpo anti-eNOS, se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón (Sigma) en una dilución 1:15000 en Leche-TBS-T 5 %. Para detectar la Actina se utilizó un anticuerpo secundario, anti-conejo IgG-HRP (1:10000).

Así, pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 h, a temperatura ambiente y con constante agitación.

Luego, se eliminó el exceso de anticuerpo secundario mediante tres lavados con TBS-T durante 5 min y se reveló la actividad enzimática del anticuerpo secundario mediante quimioluminiscencia (Western Blot Chemiluminescence Reagent NEN, Boston, MA, USA) y se detectaron las señales en una película de rayos X (Kodak MXG / Plus, Rochester, NY, EE.UU.).

Finalmente, la intensidad de las bandas se determinó por densitometría utilizando un programa informático (Scion Image Software, Scion Corporation, NIH, Baltimore, USA). La cantidad relativa de eNOS se determinó en base a la intensidad de la señal de las bandas normalizadas con la señal de Actina.

Todas estas determinaciones fueron realizadas durante una pasantía (la cual contó con la aprobación del Consejo Departamental) bajo la dirección de la Dra. Ana Carolina Donadio, del Departamento de Bioquímica Clínica (CIBICI-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba, Argentina.

6.2.1.1.6. Análisis de los datos

En los ensayos de citotoxicidad se utilizaron los criterios de Chauvenet para identificar los puntos que se debieran rechazar, debido a la dispersión de los datos.

Las diferencias estadísticamente significativas en los ensayos de Western Blot, fueron analizadas utilizando el test de Kruskal-Wallis dado que la varianza no cumple con el supuesto de homocedasticidad. Como test a posteriori se utilizó el test de Dunn.

En todos los casos un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para los análisis se utilizó el programa GraphPad InStat o Sigma Stat (versión 2.03) y los gráficos fueron realizados en el programa Excel.

6.2.1.2. Resultados

Como se puede observar en la Tabla 6.1, bajo nuestras condiciones experimentales, *P. saururus* no mostró efecto citotóxico, ya que todas las células presentaron una viabilidad igual o superior al 90 %.

Tabla 6.1. Viabilidad celular de células mononucleares cultivadas con 500, 100 ó 50 µg/mL de decocción de *P. saururus*, en comparación con el grupo Control.

Tiempo (h)	Control	Decocción (µg/mL)		
		500	100	50
24	100 %	98 %	96 %	90 %
48	100 %	95 %	98 %	100 %

Una vez asegurada que las condiciones experimentales eran las adecuadas para las células, se realizó la determinación de la expresión de la eNOS en células mononucleares tratadas con la decocción de *P. saururus*.

El revelado del Western Blot evidenció una banda específica a 140 kDa que es congruente con la banda originada por la eNOS detectada en el control positivo.

El análisis de la intensidad de las bandas nos permitió determinar que se manifestó un aumento significativo en la expresión de la enzima eNOS cuando las células fueron cultivadas con 50 µg/mL de decocción de *P. saururus* a las 24 h (KW = 10.242; p<0,05), (Figura 6.1). El resto de los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados),

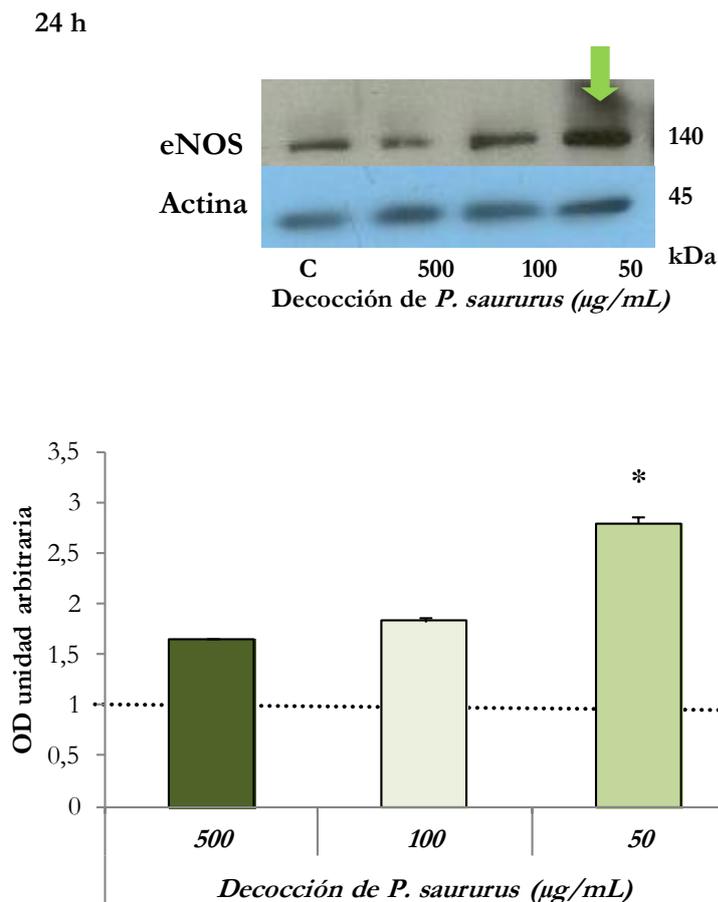


Figura 6.1. Expresión de la proteína eNOS en células mononucleares tratadas con 500, 100 o 50 µg/mL de decocción de *P. saururus*, en comparación con el Control a 24 horas de cultivo. La línea de puntos representa el valor del grupo control. La densidad óptica relativa de cada banda se representa como la media \pm SEM. Los resultados se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. * $p < 0,05$ vs. Control.

6.2.1.3. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que la decocción de *P. saururus* en una concentración de 50 µg/mL produjo un aumento en la expresión de la enzima eNOS a las 24 h de cultivo, en células mononucleares. De acuerdo a esto último, se esperaría que al menos parte del efecto prosexual observado para la decocción, se produzca por este incremento en la concentración de la enzima eNOS, quien debería generar un acrecentamiento en los niveles de NO. Este aumento de NO en células endoteliales,

repercutiría en una mejora en la erección peneana. Más estudios serien necesarios para determinar si se modifican otras isoformas de la enzima.

Dado que existen reportes que indican que el nivel de la enzima eNOS se encuentra disminuido en las células mononucleares de pacientes con disfunción eréctil de origen vascular (Mateos-Cáceres y col., 2006), se podría hipotetizar que la decocción de *P. saururus* podría ser considerada como un fármaco potencialmente útil en este tipo de patología.

6.2.2. Experimento 2: Concentración de NO en el plasma de ratas macho adultas mayores tratadas con la decocción de *P. saururus* y administrada a dosis repetidas

Parte de las disfunciones eréctiles son causadas por alteraciones de la relajación del músculo liso, originada por un nivel insuficiente de óxido nítrico en el sistema vascular.

Dado que la decocción de *P. saururus*, produce un aumento de la enzima eNOS, se esperaría que se genere un aumento en la concentración de NO plasmático. Por ello nos propusimos determinar si la mejora en la conducta sexual observada en animales adultos mayores tratados con decocción de *P. saururus* a dosis repetidas, era producida por un aumento en la concentración de NO en el plasma de los animales. Para probar esta hipótesis se realizó el experimento de conducta sexual que figura en la página 93 en el capítulo 5.

6.2.2.1. Material y métodos

6.2.2.1.1. Obtención y preparación de las muestras de plasma

En este caso, se trabajó con un modelo pareado en el cual, un grupo de 5 ratas fueron administradas el día 0 con solución fisiológica por vía i.p. y posteriormente, ensayadas en conducta sexual. Se las dejó descansar dos días, y se les administró durante 5 días consecutivos, 10 mg/kg de decocción de *P. saururus*. Los días 1, 3 y 5 del tratamiento, las ratas fueron ensayadas en conducta sexual.

Inmediatamente después de terminar la serie copulatoria se anestesiaron los animales y se les extrajo muestras de sangre periférica, por punción cardíaca, utilizando jeringas heparinizadas.

La determinación de los niveles de NO plasmático en el día 0 fue considerado como control y nivel basal, el que serviría para comparar con el nivel de los siguientes días. Cabe aclarar que en este caso se habla de niveles de NO basales luego de completada la serie copulatoria, no de los niveles que normalmente tienen los animales en reposo.

En todos los casos, las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm para lograr la separación del plasma. Las muestras de plasma se separaron y se desproteinizaron con $ZnSO_4$ para reducir la turbidez (Tinco y col., 2011). De esta manera, a 1,6 mL de plasma se le agregó, 1,2 mL de agua destilada, 0,2 mL de NaOH 1M y 0,2 mL de $ZnSO_4$ al 30 %. Las muestras se agitaron tres veces durante un min, obteniendo una solución lechosa. Luego de centrifugar a 3500 rpm durante 10 min, el sobrenadante obtenido se utilizó para la medición mediante la técnica de Griess.

6.2.2.1.2. Cuantificación del NO

Para determinar los niveles plasmáticos de NO, se realizó una medición indirecta a través de los nitratos y nitritos, que son metabolitos estables de NO. Estos aniones fueron detectados colorimétricamente por el reactivo de Griess.

Para la reducción de nitratos, se añadió una alícuota de zinc metálico en polvo a 1 mL de plasma desproteinado y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1:45 h, agitando las muestras cada 30 min, centrifugándose las muestras a 3500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, los sobrenadantes se sembraron en una placa 96 pocillos cada uno por triplicado. En cada pocillo se sembraron 100 μ L del sobrenadante más igual volumen de reactivo de Griess y se dejó incubar la placa por 10 min, en la oscuridad. Pasado el tiempo establecido, se midió la absorbancia a 540 nm mediante un lector de absorbancia en microplaca (Beipackliste, Packinglist, Sunrise Basic, Tecan, Gröding, Austria).

Paralelamente, se realizó una curva estándar de nitritos a partir de una solución madre de $NaNO_2$ 10 mM, con las siguientes concentraciones: 0; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50 y 100 mM en agua miliQ.

Con estos datos, se realizó una curva estándar trazando la absorbancia de cada punto, frente a la concentración (Figura 6.2) y se obtuvo la ecuación de la recta que permitirá determinar la concentración de NO presente en las muestras de plasma.

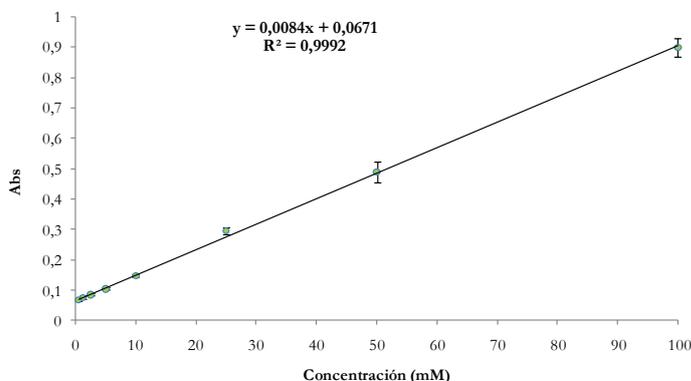


Figura 6.2. Curva de calibrado utilizando 0; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50 y 100 mM de NaNO_2

6.2.2.2. Resultados

El análisis de los resultados obtenidos muestra que la concentración plasmática de NO de los animales tratados con 10 mg/kg de decocción de *P. saururus* aumentó significativamente al quinto día de tratamiento en relación al grupo control ($F_{(3,12)}:23.674$; $p < 0,001$). Así, los niveles de NO se elevaron de $4,80 \pm 0,78 \mu\text{mol/mL}$ a $8,69 \pm 0,36 \mu\text{mol/mL}$ (Figura 6.3).

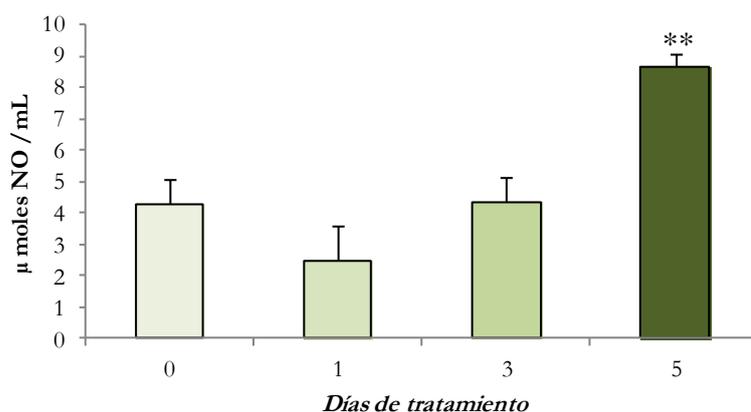


Figura 6.3. Concentración de NO en el plasma de las ratas tratadas con decocción de *P. saururus* (10 mg/kg) durante los días 1, 3 y 5 del tratamiento, en comparación con su concentración basal (Día 0). Los resultados se analizaron con ANOVA para medidas repetidas y posteriormente con Bonferroni y se expresan como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$ en comparación con el control.

6.2.2.3. Conclusiones parciales

Estos resultados indicarían que la mejora en la conducta sexual observada el quinto día del tratamiento en ratas macho adultas mayores que recibieron 10 mg/kg de decocción de *P. saururus*, se producirían, al menos en parte, debido a un aumento en los niveles plasmáticos de NO. Estudios adicionales son necesarios para concluir si estos efectos es producido por la administración de la decocción (en machos sin conducta sexual) o por la repetición de la conducta sexual (machos con conducta sexual sin administración de decocción).

Estos datos nos dan un indicio que, al menos en forma parcial, el mecanismo por el cual se desarrolla el efecto prosexual en ratas adultas administradas a dosis repetida sería mediado por la vía nitrérgica.

6.2.3. Experimento 3: En el modelo de eyaculación ficticia, ¿Por cuál mecanismo actúa la decocción de *P. saururus*?

Si bien la respuesta eyaculatoria es regulada por el SNC, parte de la regulación se encuentra a nivel espinal. Este experimento se diseñó para investigar el mecanismo(s) medular que pudiera estar involucrado en el efecto proeyaculatorio observado para la decocción de *P. saururus* (ver Capítulo 4).

6.2.3.1. Material y métodos

Para cumplir este objetivo, se decidieron evaluar cinco de los neurotransmisores más importantes implicados en la regulación espinal de la eyaculación, abarcando así, las vías oxitocinérgica, colinérgica, adrenérgica, nitrérgica y serotoninérgica (Carro-Juárez y col., 2004, 2006; Kada Sanda y col., 2013; Lee y col., 2011; Mao y col., 2014; Singh y Singh, 2012; Estrada-Reyes y col., 2013).

Para ello, se trabajó con ratas Wistar macho (ver capítulo 4, Eyaculación ficticia) a las que se reunió en 6 grupos. Los primeros 5 grupos recibieron respectivamente los siguientes antagonistas o inhibidores: atosiban (1 mg/kg), hexametonio (30 mg/kg), prazosina (10 µg/kg), L-NAME (30 µg/kg) o WAY 100635 (3 µg/kg) y tres min más tarde, 3 µg/animal

de la decocción. El último grupo recibió decocción en una dosis de 3 µg/animal. Las ratas de cada uno de los grupos fueron administradas por vía endovenosa.

Después de los tratamientos individuales, los animales fueron ensayados tal como se describió en el ensayo de eyaculación ficticia (Capítulo 4, pág. 58) y todos recibieron estimulación mecánica a intervalos de 3 min, hasta la inhibición del tren motor eyaculatorio.

6.2.3.2. Resultados

Como se vió en el capítulo 4, de los 4 parámetros analizados la decocción modifica la LD y el ND, por lo que en este ensayo se buscó determinar que antagonista bloquea estos efectos.

Al analizar la LD se vio que salvo prazosina (U: 0,000; $p < 0,01$), los otros antagonistas no bloquean el efecto producido por la decocción ($p > 0,05$). Así prazosina, antagonista adrenérgico, produjo una inhibición más duradera del tren motor, bloqueando parcialmente el efecto proeyaculatorio observado cuando se usó la decocción.

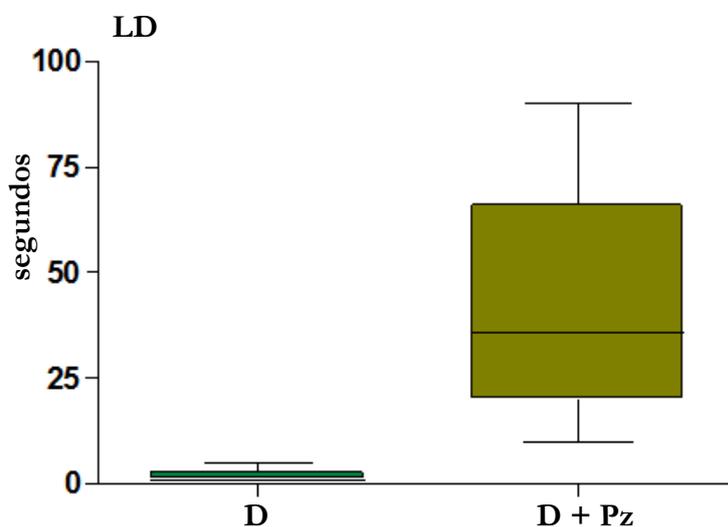


Figura 6.4. Valoración del efecto de la vía adrenérgica sobre la latencia de descarga (LD). Comparación del efecto observado en el patrón motor eyaculatorio en respuesta a 3 µg/animal de decocción de *P. saururus* (D), en comparación con el grupo de animales que recibió la decocción más el antagonista prazosina (D+Pz). Los valores se expresan como la mediana y el rango intercuartílico (Q1 y Q3). Los resultados fueron analizados mediante el test de Mann-Whitney, $p < 0,01$.

Al analizar el otro de los parámetros modificado por la decocción, ND, se vio que todos los grupos que recibieron antagonistas + decocción producen menos descargas que la decocción (U: 0,000; $p < 0,01$). Estos resultados demuestran que el efecto sobre la potencia eyaculatoria que demostró producir la decocción de *P. saururus* es mediado, al menos en parte, por las vías oxitocinérgica, colinérgica, adrenérgica, nitrérgica y serotoninérgica.

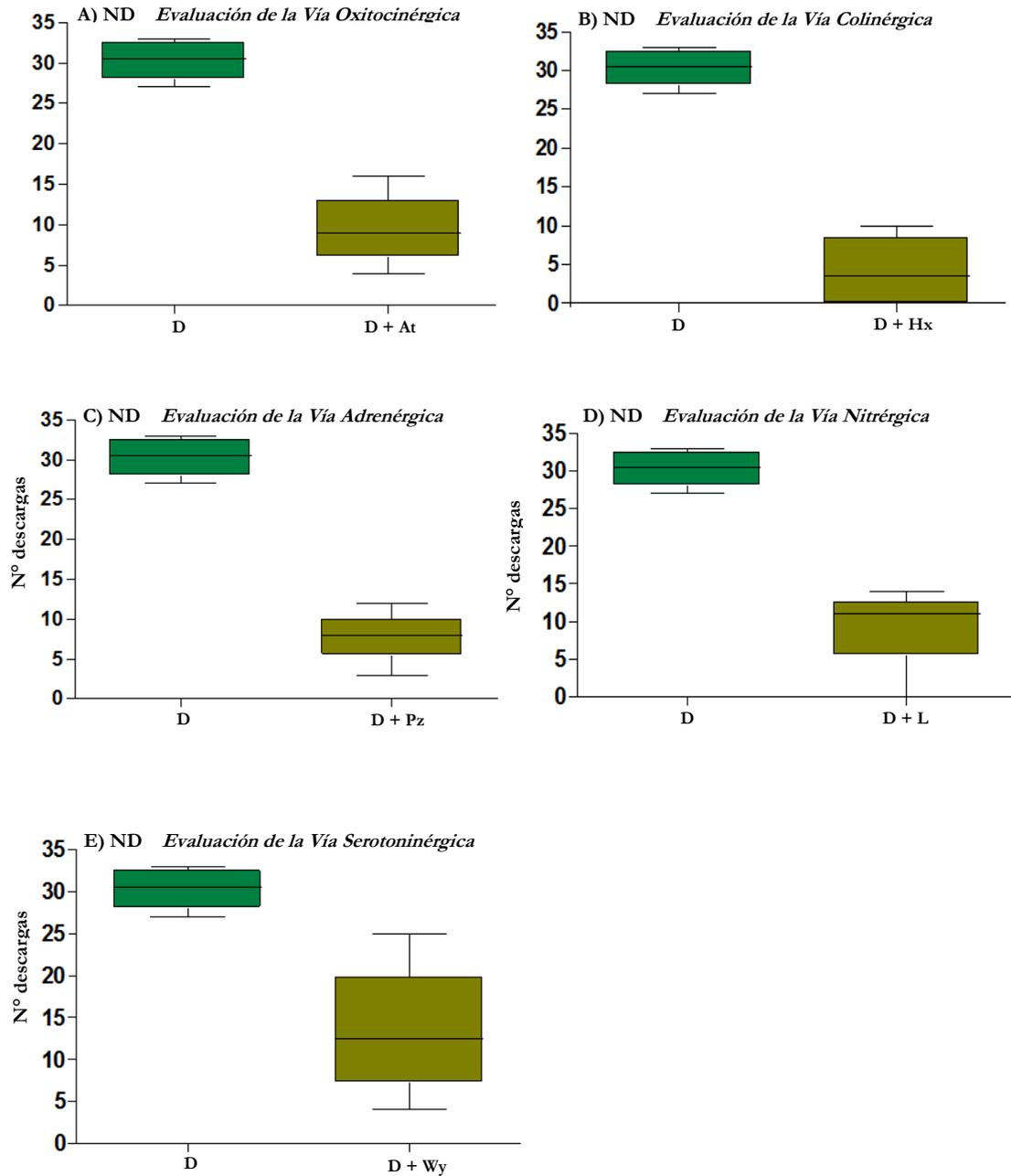


Figura 6.5. Valoración del efecto sobre el número de descargas (ND) de las vías oxitocinérgica, colinérgica, adrenérgica, nitrérgica y serotoninérgica. Comparación del efecto observado en el patrón motor eyaculatorio en respuesta a 3µg/animal de decocción de *P. saururus* (D), en comparación con el grupo de animales que recibió la decocción más el antagonista/inhibidor **A**) Atosiban (D + At), **B**) Hexametonio (D + Hx), **C**) Prazosina (D+Pz), **D**) L-NAME (D + L), **E**) WAY (D + Wy). Los valores se expresan como la mediana y el rango intercuartil (Q1 y Q3). Los resultados fueron analizados mediante el test de Mann-Whitney, $p < 0,01$.

6.2.3.3. Conclusiones parciales

En conjunto, estos datos indican que los compuestos contenidos en la decocción de *P. saururus*, responsables de aumentar la potencia eyaculatoria, actúan al menos parcialmente por las vías oxitocinérgica, colinérgica, adrenérgica, nitrérgica y serotoninérgica.

Por otro lado se comprobó que la facilitación del umbral eyaculatorio y la reducción de la inhibición del PMGE promoviendo la eyaculación que produce la decocción es mediada, al menos en parte, por la vía adrenérgica.

6.3. Conclusiones

Los experimentos *in vitro* desarrollados nos permitieron demostrar que la decocción de *P. saururus* actúa produciendo un aumento en la formación de la enzima eNOS en células mononucleares de sangre periférica. Podría extrapolarse a células endoteliales, donde el aumento de la enzima eNOS cuando estas células están localizadas en el pene, favorecería el aumento de NO y por consiguiente la erección. Sin embargo no podemos descartar la participación de la enzima nNOS, debido al importante rol que desempeña en la erección.

Se comprobó mediante experimentos *ex vivo* que, efectivamente, los animales adultos mayores tratados con decocción a dosis repetida, que copularon con una latencia menor que los controles, tenían los niveles plasmáticos de NO aumentados. Podría asociarse este

aumento con la presencia (entre otros) del aminoácido arginina en la decocción (Vallejo y col., 2013), el cual claramente es precursor del NO.

Por otro lado, en experimentos *in vivo* se demostró que todos los antagonistas aquí empleados (atosiban, hexametonio, prazosina, L-NAME y WAY) bloquean, al menos parte, del efecto proeyaculatorio observado en los animales espinalizados luego de la administración de la decocción de *P. saururus*. Esto sugiere que los mecanismos oxitocinérgicos, colinérgicos, adrenérgicos, nitrérgicos y serotoninérgica espinales son parcialmente activados por la actividad afrodisíaca de la decocción. Esta afirmación está basada en la mejora de la potencia eyaculatoria observada en los animales espinalizados.

Por último, sabiendo que los sujetos que sufren DE de tipo vascular tienen disminuida la concentración de eNOS en las células mononucleares (Mateos-Cáceres., 2006) y de acuerdo a los resultados aquí obtenidos, la decocción de *P. saururus* podría ser considerada de potencial aplicación medicamentosa para estos casos.

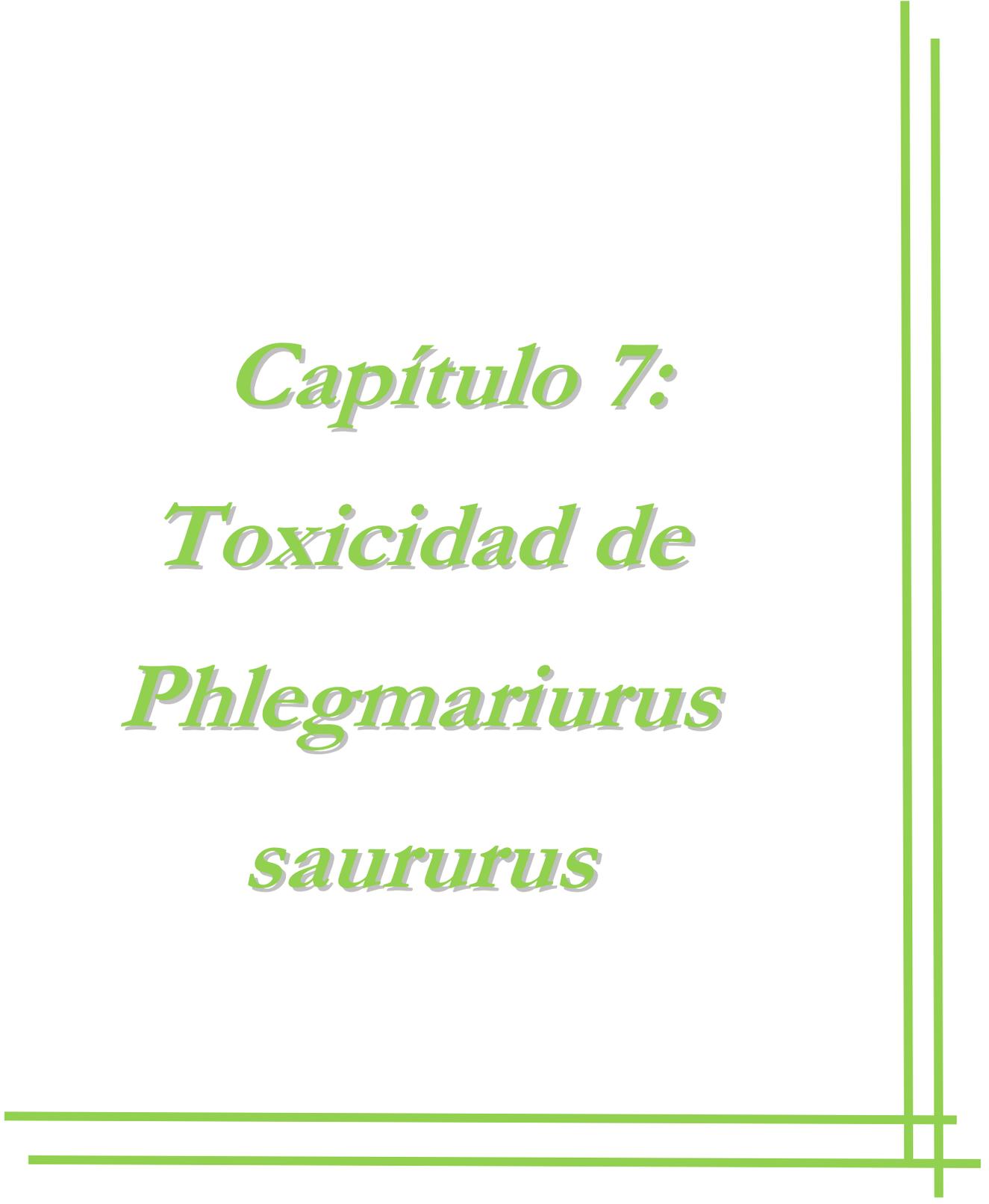
6.4. Bibliografía

- Argiolas, A., Melis, M.R., 2013. Neuropeptides and central control of sexual behavior from the past to the present: a review. *Prog. Neurobiol.*, 108, 80-107.
- Birri, M., Franco, M., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese M., 2014. *Huperzia saururus* Lam. Trevis. (Lycopodiaceae) facilitates ejaculation in spinal cord transected male rats. *J. Ethnopharmacol.* 157, 38–44.
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Carro-Juárez, M., Cervantes, E., Cervantes-Méndez, M., Rodríguez-Manzo, G., 2004. Aphrodisiac properties of *Montanoa tomentosa* aqueous crude extract in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 78, 129–134.

- Carro-Juárez, M., Lobaton, I., Benitez, O., Espiritu, A., 2006. Pro-ejaculatory effect of the aqueous crude extract of cihuapatli (*Montanoa tomentosa*) in spinal male rats. *J. Ethnopharmacol.*, 106, 111–116.
- Estrada-Reyes, R., Carro-Juárez, M., Martínez-Mota, L., 2013. Pro-sexual effects of *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) in male rats involves the nitric oxide pathway. *J. Ethnopharmacol.*, 146, 164-172.
- Hull, E.M., Rodríguez-Manzo, G., 2017. Male Sexual Behavior. In Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier. Ámsterdam. ISBN 9780128093245
- Jiménez, A., Arriero, M., Lopez-Blaya, A., González-Fernández, F., Garcia, R., Fortes, J., Millas, I., Velasco, S., Sanchez, DM., Rico, L., Farre, J., Casado, S., López-Farre, A., 2001. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in the vascular wall and in mononuclear cells from hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, 104, 1822–1830.
- Kada Sanda, A., Miegueu, P., Bilanda, D.C., Faleu Nya Ngassam, M., Watcho, P., Djomeni, P.D., Kamtchouing, P., 2013. Ejaculatory activities of *Allanblackia floribunda* stem bark in spinal male rats. *Pharm. Biol.*, 51(8), 1014-1020.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227: 680-685.
- Lee, M.R., Yun, B.S., In, O.H., Sung, C.K., 2011. Comparative study of Korean white, red, and black ginseng extract on cholinesterase inhibitory activity and cholinergic function. *J. Ginseng Res.*, 35(4), 421-428.
- Lees, P., Cunningham, F.M., Elliott, J., 2004. Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 27, 397–414.
- Mao, H., Wang, H., Ma, S., Xu, Y., Zhang, H., Wang, Y., Niu, Z., Fan, G., Zhu, Y., Gao, X.M., 2014. Bidirectional regulation of bakuchiol, an estrogenic-like compound, on catecholamine secretion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 274(1), 180-189.
- Mateos-Cáceres, P.J., Garcia-Cardoso, J., Lapuente, L., Zamorano-León, J.J., Sacristán, D., de Prada, T.P., Calahorra, J., Macaya, C., Vela-Navarrete, R., López-Farré, A.J., 2006. Soluble guanylate cyclase beta1-subunit expression is increased in mononuclear cells from patients with erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, 18(5), 432-437.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 65 (1-2), 55-63.

- Singh, A.P., Singh, R., 2012. Potent natural aphrodisiacs for the management of erectile dysfunction and male sexual debilities. *Front. Biosci.*, 1 (4), 167-180.
- Tinco, A., Arroyo, J., Bonilla, P., 2011. Efecto del extracto metanólico de *Jatropha macrantha* Müll. Arg., en la disfunción eréctil inducida en ratas. *An. Fac. Med.*, 72 (3), 161-168.
- Vallejo, M., Dimmer, J., Ortega, M., Cabrera, J.L., Agnese, M., 2013. Amino acids content and acetylcholinesterase inhibition of *Hyperzja saururus* infusion and decoction. *Pharm. Biol.*, 51 (10), 1341-1345.

Capítulo 7:
Toxicidad de
Phlegmarius
saururus



¿*Phlegmariurus saururus* es realmente tóxica?

7.1. Introducción

Frecuentemente, se suele escuchar afirmar que "las plantas medicinales son inocuas". Para hacer esta aseveración las personas se basan en el simple hecho de que son productos naturales y por lo tanto, se cree que son seguros. Sin embargo, es muy conocido que esta premisa es incorrecta, basta mencionar algunos ejemplos de tóxicos extraídos de productos naturales como la coniína, alcaloide presente en *Conium maculatum* (cicuta) o la estricnina, el principal alcaloide de *Strychnos nuxvomica* (nuez vómica).

Aun las sustancias que se utilizan con fines medicinales (ya sean naturales o sintéticas) pueden ocasionar efectos tóxicos. La toxicidad de un fármaco aparece cuando se supera la dosis terapéutica, e incluso dentro del rango terapéutico muchos fármacos producen efectos adversos. Ya en el siglo XVI, Paracelso afirmaba que "todas las sustancias son tóxicas y ninguna sustancia es tóxica. Sólo la dosis determina la toxicidad".

En capítulos anteriores se pudo corroborar que la decocción de *P. saururus* tiene importantes efectos prosexuales (Birri y col, 2014; 2017), por lo que el siguiente estudio preclínico de importancia a realizar es evaluar la toxicidad, aun más, teniendo en cuenta que existen en la bibliografía reportes que indican que la planta tendría efectos tóxicos (Amorín, 1974; Ministerio de Salud y Acción Social, 2002).

7.2. Material y métodos

Para determinar si la decocción de *P. saururus* administrada en forma aguda produce toxicidad en ratas Wistar se realizaron ensayos siguiendo distintos lineamientos internacionales de toxicidad (OMS, 2002; ANVISA, 2010; OECD/OCDE, 2001).

Los ensayos fueron realizados en el bioterio del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas – UNC.

Las ratas fueron alojadas en grupos (3 por jaula) y mantenidas en un ciclo invertido Luz/Oscuridad 12:12 h, a 22 °C y con libre acceso a comida y agua.

Del ensayo participaron 4 grupos de animales. Dos, estaban formados por hembras de 9 - 10 semanas (por ser en general el sexo femenino más sensible, de acuerdo a las

normas oficiales). Todas estaban fuera del estado de preñez y en nuliparidad (OECD/OCDE, 2001). Los otros dos grupos estuvieron conformados por machos de 20 semanas, con la finalidad de evaluar la edad como parámetro de susceptibilidad.

Siguiendo las normas internacionales, se trabajó con la misma vía de administración en la cual la decocción es efectiva como afrodisíaca. Así, todas las administraciones se realizaron por vía oral, mediante el uso de cánulas, para asegurar que los animales recibiesen la dosis completa, particularmente en este caso que se trata de una sustancia de sabor desagradable (amargo) y que el volumen a administrar es grande.

El grupo control recibió agua destilada y el grupo problema fue tratado con 2000 mg/kg de decocción de *P. saururus* en una única toma. Es importante destacar que previamente, se desarrollaron estudios pilotos que nos permitieron determinar que dosis menores no producían mortalidad, por lo que se decidió trabajar con la máxima concentración aceptada para ensayos de toxicidad aguda (OECD/OCDE, 2001).

Luego de la administración, los animales fueron observados durante las primeras 6 h en forma ininterrumpida y en distintos intervalos de tiempo, el resto del día. En las siguientes 48 h se observaron dos veces al día y en los 14 días posteriores, se realizó al menos una observación diaria.

El peso de los animales se determinó al comienzo y al final de estudio, como así también la cantidad de agua y alimentos consumidos.

Además, a los animales se les extrajo sangre antes del ensayo y al finalizar, para poder realizar distintos estudios hematológicos, y pruebas bioquímicas relacionadas con la función renal, hepática y otras específicas, que pudieran alertar sobre toxicidad.

Para la extracción de sangre, el animal fue previamente anestesiado con una mezcla de Ketamina/Xilacina (Holliday, Buenos Aires, Argentina/Richmond, Buenos Aires, Argentina, 90:5) administrado por vía i.m. La extracción de sangre se realizó mediante punción cardíaca empleando jeringas de 2 mL de capacidad y agujas 25G x 16mm. Las muestras para el examen hematológico fueron recogidas sobre EDTAK3 (1 mg/mL) y analizado dentro de las 2 h de obtenida. Para las pruebas bioquímicas se dejó coagular la sangre a 37 °C y el suero libre de hemólisis obtenido fue mantenido a -20 °C hasta su ensayo.

Finalizado el periodo de observación, los animales fueron anestesiados para extraerles sangre y posteriormente sacrificarlos. El método de eutanasia seleccionado fue la dislocación cervical.

Finalmente, se sometió a los animales a cirugía para extraer distintos órganos con el fin de realizar exámenes histopatológicos que pudieran mostrar signos de toxicidad.

7.2.1. Observaciones realizadas

Durante todo el período se observó a los animales en busca de signos de toxicidad, registrando gravedad, aparición, progresión y reversibilidad, en función del tiempo. No sólo se observó si se producía la muerte de los animales, sino que también se evaluó su perfil de comportamiento (estereotipos, irritabilidad, sedación), el perfil neurológico (convulsiones tónico clónicas, incoordinación motora) y el perfil autonómico (salivación, piloerección, contorsión abdominal, emesis, diarrea), (OECD/OCDE, 2001).

Todos los grupos fueron filmados las primeras 6 h del ensayo para realizar una mejor interpretación de los resultados.

7.2.2. Pruebas hematológicas

Con la finalidad de descartar algún signo de toxicidad que no se hubiere detectado en las observaciones anteriormente mencionadas, se desarrollaron una serie de análisis hematológicos de rutina (Halim y col., 2011).

Para el mejor análisis de los animales se trabajó con un modelo pareado, en donde cada animal fue su propio control (análisis pre y post tratamiento). Así, las ratas administradas con decocción fueron comparadas no sólo con su grupo control sino también con ellas mismas antes de comenzar el ensayo.

A continuación se detallan la serie de análisis hematológicos desarrollados.

Pruebas relacionadas con:

Glóbulos rojos

Conteo de eritrocitos (**CGR**),
Concentración de hemoglobina (**HGB**),
Volumen corpuscular medio (**VCM**),
Hemoglobina corpuscular media (**HCM**),
Concentración de hemoglobina corpuscular media (**CHCM**),
Amplitud de distribución de eritrocitos (**ADE-CV%**),
Hematocrito (**HTC**).

Glóbulos blancos

Recuento de glóbulos blancos absoluto (RGB), y diferencial, Neutrófilos segmentados (**NS**), Linfocitos (**L**), y Monocitos (**Mo**).

Plaquetas

Conteo de plaquetas (**PLT**),
Distribución de volumen (**MPV**).

Todas estas determinaciones fueron realizadas con la colaboración del Dr. Hugo Guglielmone del Departamento de Bioquímica Clínica (CIBICI-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba, Argentina.

7.2.3. Pruebas relacionadas a la función renal, hepática y otras específicas

Además de los análisis hematológicos de rutina, se realizaron una serie de determinaciones para comprobar funciones metabólicas y/o de excreción de fármacos que pudieran estar alteradas (OECD/OCDE, 2001).

Así, se midió la función renal, ya que el riñón es el órgano más importante involucrado en la excreción de distintas sustancias. Al mismo tiempo, se midió la función hepática, debido a que el hígado es el encargado principal del metabolismo de los fármacos. En el mismo sentido, se determinó la función pancreática endócrina y mediciones relacionadas al metabolismo lipídico.

Las pruebas específicas desarrolladas en suero, fueron:

Riñón: Urea, Creatinina, Ac. Úrico

Hígado: Amino aspartato transferasa (AST), Amino alanina transferasa (ALT), Fosfatasa alcalina (FAL), Proteínas totales

7.2.4. Análisis histopatológicos

Los órganos extraídos incluyeron: corazón, pulmón, riñón, páncreas, hígado y finalmente pene u ovarios, según correspondiese.

Dicho material fue remitido al Laboratorio de Anatomía Patológica del Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina.

7.2.5. Análisis de los datos

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, los datos fueron analizados mediante la prueba del test T-Student, teniendo en cuenta si se trataba de análisis de muestras apareadas o no. Así, el análisis entre grupos control y tratamiento siguió un modelo no pareado, mientras que las comparaciones que se realizaron en cada grupo con pre y post-tratamiento, fueron tratados como modelos pareados.

En todos los casos un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

Para los análisis se utilizó el programa GraphPad InStat y los gráficos fueron realizados en el programa Excel.

73. Resultados

Diez min después de la administración de 2000 mg/kg de la decocción de *P. saururus*, en ambos grupos de animales (machos y hembras) se observaron alteraciones en el comportamiento, las que se hicieron más evidentes hacia la media hora.

Dichos cambios incluyeron contracciones abdominales y temblores, los que se acrecentaron en intensidad hasta producir en algunos casos, saltos repentinos, en forma esporádica. Estas manifestaciones produjeron una disminución en el grado de exploración de los animales y acrecentó su comportamiento gregario.

El efecto observado comenzó a decaer lentamente, hasta revertir por completo a las 6 h.

No se evidenció ningún otro signo de toxicidad tal como piloerección, vómitos, diarrea, convulsiones, sensibilidad a los sonidos, u otros.



Tal como se explicó anteriormente, luego de la reversión de los síntomas, los animales continuaron por 15 días más en observación sin demostrar ninguna afectación posterior.

Es importante destacar que la decocción de *P. saururus* administrada en forma oral a una única dosis de 2000 mg/kg, no produjo la muerte de ningún animal, en ninguno de los dos grupos.

Por otro lado, se controló la variación en el peso de los animales durante el tiempo que duró el experimento. Así, se determinó que no hubo cambios significativos en relación al peso de las ratas del grupo control ni del problema, después de los 16 días que duró el ensayo ($p > 0,05$).

En el caso de las hembras jóvenes, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de agua y alimentos consumidos ($p > 0,05$) en relación al control. Sin embargo, para los machos adultos tratados con decocción, se observó un mayor consumo de alimentos en comparación con los animales del grupo control ($p < 0,0001$).

En la tabla 7.1 se observan los resultados de los análisis hematológicos desarrollados. En A, se hace referencia a los machos y en B, a las hembras. El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas cuando los grupos problema fueron comparados con el control o con ellos mismos, pre-tratamiento con decocción de *P. saururus* ($p > 0,05$).

Tabla 7.1: Análisis hematológicos efectuados antes del tratamiento, en comparación con los realizados a los 15 días de haber recibido 2000 mg/kg de decocción de *P. saururus*, o agua destilada (Control).

A) MACHOS				
Parámetros analizados	Pre-tratamiento		Post-tratamiento	
	Control	Decocción	Control	Decocción
RGB (x10³/mL)	7,85 ± 0,65	4,88 ± 1,51	9,45 ± 1,45	3,08 ± 0,59
NS (%)	15,00 ± 3,00	13,75 ± 1,75	13,00 ± 0,00	14,25 ± 2,02
L (%)	77,50 ± 5,50	82,00 ± 2,00	79,50 ± 0,50	76,25 ± 2,69
Mo (%)	7,50 ± 2,50	4,25 ± 1,44	8,40 ± 0,40	9,50 ± 0,96
CGR (x 10⁶ µL)	7,49 ± 0,37	6,71 ± 0,10	8,55 ± 0,08	5,66 ± 0,29
HGB (g/dL)	14,05 ± 0,65	11,50 ± 1,57	15,95 ± 0,25	10,90 ± 0,51
HTC (%)	42,15 ± 1,95	37,90 ± 0,48	48,10 ± 1,00	34,10 ± 2,39
VCM (fL)	56,30 ± 0,20	56,48 ± 0,51	56,30 ± 0,60	55,85 ± 0,37
HCM (pg)	18,75 ± 0,05	17,10 ± 2,27	18,70 ± 0,10	19,28 ± 0,18
CHCM (g/dL)	33,33 ± 0,00	30,25 ± 3,92	33,15 ± 0,15	34,50 ± 0,15
ADE-CV%	16,35 ± 0,55	15,80 ± 0,73	14,65 ± 1,25	14,55 ± 0,47
PLT (x 10³µL)	794,50 ± 224,50	787,25 ± 140,55	816,00 ± 0,00	722,25 ± 32,59
MPV (fL)	7,35 ± 0,15	7,67 ± 0,20	7,95 ± 0,25	7,65 ± 0,05

B) HEMBRAS				
Parámetros analizados	Pre-tratamiento		Post-tratamiento	
	Control	Decocción	Control	Decocción
RGB (x10³/mL)	10,10 ± 2,26	7,10 ± 1,08	7,23 ± 0,61	7,33 ± 0,14
NS (%)	13,33 ± 3,53	11,75 ± 3,84	10,33 ± 0,88	10,50 ± 1,26
L (%)	81,33 ± 3,28	85,75 ± 3,64	87,00 ± 1,00	66,13 ± 19,30
Mo (%)	5,33 ± 0,33	2,50 ± 0,29	3,33 ± 0,88	4,75 ± 1,11
CGR (x 10⁶ µL)	7,08 ± 0,14	6,72 ± 0,09	6,35 ± 0,23	6,63 ± 0,18
HGB (g/dL)	14,70 ± 0,40	14,30 ± 0,21	12,80 ± 0,39	13,60 ± 0,41
HCM (%)	41,57 ± 1,55	39,78 ± 1,05	45,13 ± 3,09	38,68 ± 1,09
VCM (fL)	58,67 ± 1,07	59,18 ± 0,75	71,53 ± 6,84	58,38 ± 0,30
HCP (pg)	20,77 ± 0,18	21,28 ± 0,06	20,33 ± 0,35	20,53 ± 0,23
CHCM (g/dL)	35,40 ± 0,40	35,98 ± 0,41	28,83 ± 3,03	35,17 ± 0,28
ADE-CV%	11,77 ± 0,33	10,13 ± 0,38	19,30 ± 2,75	12,55 ± 0,47
PLT (x 10³µL)	940,33 ± 35,14	669,0 ± 102,5	848,67 ± 26,03	806,00 ± 25,41
MPV (fL)	7,53 ± 0,18	7,32 ± 0,06	7,67 ± 0,18	7,57 ± 0,24

RGB, Recuento de glóbulos blancos; NS, Neutrófilos segmentados, L, Linfocitos; Mo, Monocitos; CGR, Conteo de eritrocitos, HGB, Concentración de hemoglobina; HTC, Hematocrito; VCM, Volumen corpuscular medio; HCM, Hemoglobina corpuscular media; CHCM, Concentración de hemoglobina corpuscular media; ADE-CV%, Amplitud de distribución de eritrocitos; PLT, Conteo de plaquetas; MPV, Volumen plaquetario medio. Los datos fueron analizados con T-Student, $p > 0,05$.

Finalmente, al analizar las pruebas bioquímicas que se realizaron para determinar si existía daño en las funciones metabólicas o excretoras, no se evidenciaron diferencias significativas para los animales antes y después del tratamiento con decocción de *P. saururus* ($p > 0,05$).

En la Figura 7.1 pueden verse los valores obtenidos para el grupo de ratas hembra jóvenes. Valores similares se encontraron en las ratas macho adultas (datos no mostrados).

No se presentan los resultados finales de los estudios histopatológicos debido a que se encuentran en etapa de análisis y aún no han sido completados.

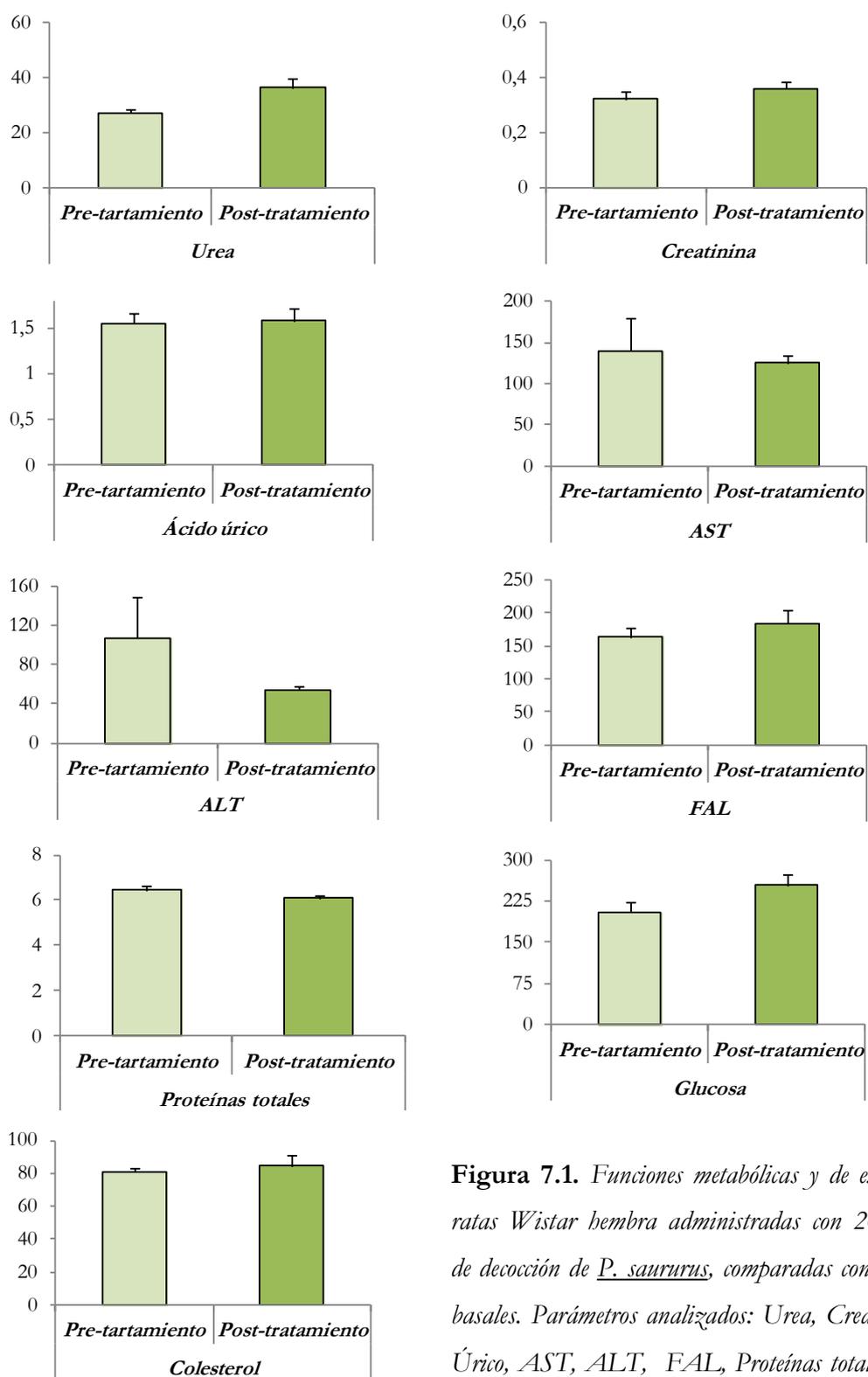


Figura 7.1. Funciones metabólicas y de excreción, de ratas Wistar hembra administradas con 2000 mg/kg de decocción de *P. saururus*, comparadas con sus valores basales. Parámetros analizados: Urea, Creatinina, Ac. Úrico, AST, ALT, FAL, Proteínas totales, Glucosa y Colesterol. Los resultados, analizados por el test de Student apareado, se expresaron como la media \pm SEM.

7.4. Conclusiones

Los resultados de los estudios de toxicidad con que se cuenta hasta el presente nos permiten afirmar en primer lugar, que la decocción de *P. saururus* administrada a dosis única de 2000 mg/kg no generó mortalidad, en ninguno de los dos grupos estudiados, ni en hembras ni en machos.

En la inspección visual se observaron claramente signos de toxicidad en los animales (temblores y contracciones abdominales) a los 10 min de la administración, los cuales tuvieron su máxima expresión a los 30 min y remitieron completamente a las 6 h de la administración.

No se detectaron valores alterados en relación a los parámetros bioquímicos o hematológicos analizados en los tiempos y dosis ensayadas.

Si bien no se cuenta en la actualidad con los resultados del estudio histopatológico, la ausencia de mortalidad, la remisión de signos tóxicos, los resultados bioquímicos y hematológicos y las pruebas de las funciones hepática, renal y otras, permiten inferir que la decocción sería segura a estas condiciones ensayadas. Esta afirmación estaría respaldada al resaltar que el rango terapéutico (de 1 a 30 mg/kg) está muy alejado del rango tóxico (2000 mg/kg).

Estos resultados, no se condicen con el reporte publicado por Amorín (1974), donde habla de "una peligrosa planta usada en medicina popular Argentina". Es importante destacar también que la presencia de signos tóxicos en sólo un caso, puede haber sido ocasionada por múltiples factores, tanto endógenos como exógenos al paciente, por lo que descartamos que la toxicidad aludida haya sido producida sólo por el consumo de esta planta autóctona de Argentina, especialmente considerando que no se hicieron estudios epidemiológicos.

7.5. Bibliografía

- Amorín, J.L., 1974. Cola de quirquincho *Urostachis saururus* (Lam.) Heter (Lycopodiaceas). Una peligrosa planta usada en medicina popular Argentina. *Farmacobotánica*, 16, 3-6.
- ANVISA- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2010. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasil.
- Birri, M., Franco, M., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese M., 2014. *Huperzia saururus* Lam. Trevis. (Lycopodiaceae) facilitates ejaculation in spinal cord transected male rats. *J. Ethnopharmacol.*, 157, 38–44.
- Birri, M., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese M., 2017. Aphrodisiac activity of *Phlegmariurus saururus* in copulating and noncopulating male rats. *Phytomedicine*, 24, 104–110.
- Halim, S.Z., Abdullah, N.R., Afzan, A., Abdul Rashid¹, B. A., Jantan, I., Ismail, Z. Acute toxicity study of *Carica papaya* leaf extract in Sprague Dawley rats. *J. Med. Plant. Res.*, 5, 1867-1872.
- Ministerio de Salud y Acción Social. Manual de intoxicaciones para agentes de atención primaria. Resolución N° 652. Expediente 1-2002-11726-01-3. Buenos Aires, 30/09/02. Disponible en la Web en http://www.msal.gov.ar/htm/site/pngcam/normas/r%2002_652%20.pdf.
- OMS- Organización Mundial de la Salud, 2002. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra.
- OECD/OCDE, 2001. OECD Guideline for testing of chemicals N° 423.

Conclusiones



La función sexual es un importante componente de la calidad de vida y del bienestar subjetivo en los seres humanos. La Disfunción Sexual es un problema médico y social, es la principal razón de impotencia masculina y es considerada uno de los más importantes problemas de Salud Pública (Gallé y Trummer, 2003).

Para dar una idea de la magnitud del problema que se pretende combatir baste ejemplificar que se estima que a nivel mundial, entre el 30 y el 40 % de los hombres mayores de 40 años sufre de algún grado de disfunción eréctil (Köhler y McVary, 2016).

Históricamente se ha tratado de resolver este problema, entre otros, mediante la búsqueda de un afrodisíaco efectivo. Mucha atención fue puesta en los efectos prosexuales de diversos agentes dopaminérgicos, adrenérgicos y serotoninérgicos, los que han sido intensamente investigados tanto en animales como en humanos. Algunos de estos fármacos fueron considerados por su potencial rol en el tratamiento de la Disfunción Sexual y otros han contribuido a la comprensión de los procesos neurofisiológicos básicos en la excitación sexual (Rosen y Ashton, 1993).

En relación a los productos naturales, en todo el mundo han sido y son utilizados cantidades de sustancias, tanto de origen animal como vegetal. Entre estos últimos, una larga lista de especies vegetales medicinales podrían señalarse como productos naturales afrodisíacos, sólo a modo de ejemplo podrían mencionarse el *Panax ginseng* C.A. Mey., perteneciente a la familia de las Aralaceae o la *Pausinystalia yohimba* Pierre ex Beille, de la familia de las Rubiaceae. Ambas especies son universalmente conocidas como drogas vegetales o por sus principios activos más importantes: los ginsennósidos y la yohimbina, respectivamente. Ambos, han recibido atención por parte de la comunidad científica (Norecino y col., 2000; Liu y col., 2015; Choi y col., 2013; Kopalli y col., 2015; Riley, 1994; Saad y col., 2013; Tanweer y col., 2010).

Entre la diversa cantidad de especies es fácil imaginar que las familias de compuestos químicos responsables de la actividad biológica son muy variadas, distinguiéndose alcaloides, esteroides, flavonoides, terpenoides, entre otros.

Siguiendo las recomendaciones de la OMS en cuanto a impulsar la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional y la moderna, sobre la base de que las prácticas peligrosas se eliminarían y sólo se promovería lo que fuese seguro y eficaz (Akerlele, 1993), dado que ya en el año 1882 *P. saururus* era mencionada por Hieronymus como una planta afrodisíaca y que en la actualidad es ampliamente conocida y utilizada por esta razón, el presente trabajo de Tesis Doctoral se presenta con el objetivo de

contribuir al conocimiento científico en relación a las sustancias usadas en la medicina tradicional como afrodisíacas. Los resultados alcanzados a lo largo de la presente investigación permiten concluir que:

El 50 % de los establecimientos relevados en la ciudad de Córdoba en el año 2013, comercializaban *Pblegmariurus saururus*, y que la Prevalencia de comercialización de la especie fue de 46,30 %. Datos obtenidos a partir de un estudio de corte.

Adicionalmente, se estableció que el 67 % de las personas que compraban *P. saururus*, lo hacían para consumirla como afrodisíaca, siendo los resultados producto de esta tesis, los primeros antecedentes científicos que corroboran este efecto.

Al estudiar químicamente la decocción, los metabolitos principales encontrados con posible actividad biológica fueron: alcaloides, aminoácidos y saponinas.

Se ha validado una técnica que permite cuantificar el contenido de alcaloides en las distintas muestras, para asegurar homogeneidad en las preparaciones. Así, se pudo determinar que la decocción de *P. saururus* posee $3,02 \pm 0,33$ % de alcaloides, expresados como sauroína.

En el modelo de Eyaculación Ficticia, *Pblegmariurus saururus* facilita el umbral eyaculatorio y reduce la inhibición promoviendo la eyaculación. Estos efectos fueron observados con la decocción, el extracto alcaloidal y los dos alcaloides aislados ensayados, sauroína y sauroxina. En todos los casos, el efecto es mejor que el demostrado por sildenafil.

Tanto la decocción como el alcaloide sauroxina, producen una mejora en la potencia eyaculatoria, dado que aumentan significativamente el número de contracciones de los músculos genitales, evidenciando la expresión de un robusto patrón motor rítmico.

El efecto producido por la decocción es significativamente mayor al del sildenafil.

Asimismo se comprobó que el extracto alcaloidal y los dos alcaloides ensayados, producen una mejora en la capacidad eyaculatoria. Los animales pueden eyacular un mayor número de veces en forma consecutiva, tanto respecto al control como a sildenafil.

Con todos estos resultados podemos afirmar que *P. saururus* es un potente afrodisíaco que actúa sobre el generador central de la eyaculación para conseguir una mejora en la eyaculación.

En experimentos *in vivo* de conducta sexual se demostró que *P. saururus* facilita la conducta sexual de la rata macho sexualmente experta, ya que produce una importante disminución en la Latencia Eyaculatoria, lo que se traduce en un marcado efecto prosexual. Este efecto es producido por la decocción, el extracto alcaloidal y por el único alcaloide ensayado: sauroxina. En todos los casos, la actividad es mejor que la producida por el sildenafil, usado como sustancia de referencia.

Al mismo tiempo se determinó que la decocción y el extracto etanólico provocan motivación en los animales tratamiento. Este efecto no sería mediado por los alcaloides.

Se ratificó entonces el efecto afrodisíaco de *P. saururus*, demostrado previamente mediante el modelo de espinalización.

Administrada a dosis repetidas, la decocción produjo efecto prosexual en ratas Wistar macho adultas mayores y sexualmente expertas. Esto se evidenció como una disminución de la Latencia Eyaculatoria en el 5to día del tratamiento.

Asimismo, la decocción hace que animales no copuladores se comporten como copuladores, mostrando rendimientos semejantes a los de animales sexualmente expertos. Este efecto no fue observado en los animales tratados con los alcaloides aislados, sauroína ni sauroxina.

Quedó demostrado igualmente que las ratas que originalmente eran no copuladoras, 15 días después de haber sido administradas con la decocción continúan actuando como ratas sexualmente expertas.

En relación al mecanismo de acción, mediante ensayos *in vitro* se observó que la decocción de *P. saururus* actúa produciendo un aumento en la expresión de la enzima eNOS en células mononucleares de sangre periférica.

Se estableció en ensayos *ex vivo* utilizando plasma de animales adultos mayores, que aquellos que copularon a un menor tiempo que los controles, tenían los niveles plasmáticos de NO aumentados. Así, nuevamente quedó en evidencia la intervención de la vía nitrérgica al producir el efecto.

En experimentos *in vivo*, en el modelo de eyaculación ficticia, se ratificó que la decocción actúa por la vía nitrérgica y que también lo hace, al menos parcialmente, por las vías colinérgica, adrenérgica, oxitocinérgica y serotoninérgica.

Mediante estudios de toxicidad aguda se estableció que la decocción de *P. saururus* administrada a dosis única de 2000 mg/kg no generó mortalidad entre las ratas sometidas al estudio, aunque sí produjo en los animales, signos de toxicidad que remitieron completamente pasadas 6 h del tratamiento.

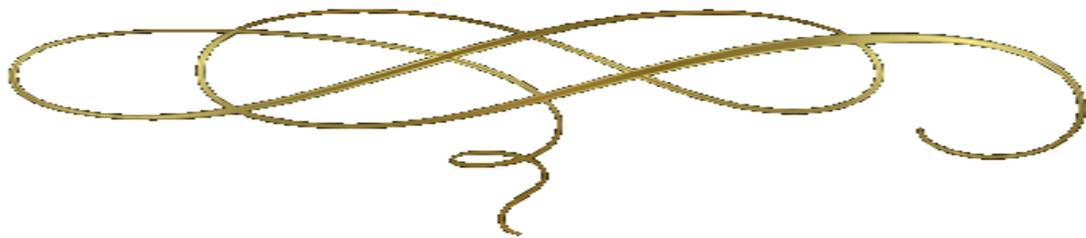
La decocción de *P. saururus* es segura a la dosis efectiva. El rango terapéutico al que produce los efectos farmacológicos (prosexuales y proeyaculatorios) es casi **67** veces menor que la dosis a la que se presentan signos de toxicidad.

Finalmente, se puede afirmar que existe un correlato entre los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis y lo que afirma la etnofarmacología, en relación a las propiedades afrodisíacas de la “cola de quirquincho”.

Bibliografía

- Akerele, O., 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mund. Salud, 14, 390-395.
- Choi, Y.D., Park, C.W., Jang, J., Kim, S.H., Jeon, H.Y., Kim, W.G., Lee, S.J., Chung, W.S., 2013. Effects of Korean ginseng berry extract on sexual function in men with erectile dysfunction: a multicenter, placebo-controlled, double-blind clinical study. Int. J. Impot. Res., 25(2):45-50.
- Gallé, G., Trummer, H., 2003. The etiology of erectile dysfunction and mechanisms by which drugs improve erection. Drugs Today (Barc), 39:193–202.
- Köhler, T., McVary, K., 2016. Contemporary Treatment of Erectile Dysfunction: A Clinical Guide, 2nd Ed. Humana Press, United States.
- Kopalli, S.R., Hwang, S.Y., Won, Y.J., Kim, S.W., Cha, K.M., Han, C.K., Hong, J.Y., Kim, S.K., 2015. Korean red ginseng extract rejuvenates testicular ineffectiveness and sperm maturation process in aged rats by regulating redox proteins and oxidative defense mechanisms. Exp. Gerontol., 69:94-102.

- Liu, T., Peng, Y.F., Jia, C., Yang, B.H., Tao, X., Li, J., Fang, X., 2015. Ginsenoside Rg3 improves_erection function in streptozotocin induced diabetic rats. *J Sex Med.*, 12(3):611-20.
- Nocerino, E., Amato, M., Izzo, A.A., 2000. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. *Fitoterapia* 71, (1): 1-5.
- Riley, A.J., 1994. Yohimbine in the treatment of erection disorder. *Br. J. Clin. Pract.*,48(3):133-6.
- Rosen, R.C., Ashton, A.K., 1993. Prosexual drugs: Empirical status of the “new aphrodisiacs”. *Arch. Sex. Behav.*, 22: 521–43.
- Saad, M.A., Eid, N.I., Abd El-Latif, H.A., Sayed, H.M., 2013. Potential effects of_yohimbine_and sildenafil on_erection dysfunction_in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 700 (1-3): 127-33.
- Tanweer, M.S., Fatima, A., Rahimnajjad, M.K., 2010. Yohimbine_can be the new promising therapy for erection dysfunction_in type 2 diabetics. *J. Pak. Med. Assoc.*, 60(11):980.



Proyecciones



- ✎ Continuar el estudio químico de *Phlegmariurus saururus* en relación a la presencia de otros constituyentes no alcaloidales en los extractos acuosos, con especial referencia a los compuestos de tipo saponinas.

- ✎ Proseguir las investigaciones en conducta sexual evaluando los alcaloides mayoritarios faltantes, tanto en animales copuladores como en no copuladores.

- ✎ Continuar los estudios sobre actividad prosexual utilizando el Modelo de Eyaculación Ficticia evaluando el efecto de 6-hidroxicopodina.

- ✎ Completar los estudios de *mecanismo de acción* evaluando a los alcaloides aislados.

- ✎ Complementar los estudios de toxicidad aguda utilizando animales distintos a los roedores e investigar toxicidad crónica.

- ✎ Realizar estudios de biodisponibilidad, de modo de mejorar los conocimientos sobre el efecto de los alcaloides de *P. saururus*.

- ✎ Evaluar los compuestos saponínicos de *P. saururus* en Actividad sexual, en ratas.

- ✎ Comenzar los estudios de actividad sexual en ratas hembras.

*Producción
científica
relacionada
con la tesis*



Presentaciones en Reuniones Científicas

“*Huperzīa saururus* effects over eNOS expression and cell toxicity”. **Birri, M.**, Pellizas, C., Donadio, A.C., Agnese, M. XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Brasil, 2012

“*Huperzīa saururus* facilita la eyaculación en ratas espinalizadas”. **Birri, M.**, Franco, M.A., Vallejo, M., Ortega, M.G., Carro Juárez, M., Agnese, M. XLIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mendoza, 2012.

“Efecto de *Huperzīa saururus* sobre la conducta sexual masculina de la rata Wistar”. **Birri, M.**, Franco, M., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese, M. XI Simposio Argentino, XIV Latinoamericano de Farmacobotánica y I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales. Rosario, 2013.

“*Huperzīa saururus* facilita la eyaculación en ratas espinalizadas”. **Birri, M.**, Franco, M.A., Vallejo, M., Carro Juárez, M., Agnese, M. Jornadas de Posgrado de la Facultad de Cs Químicas. UNC. Córdoba, 2013.

“*Huperzīa saururus* modifica la conducta sexual en machos no copuladores”. **Birri, M.**, Vallejo, M., Carro Juárez, M., Agnese, M. XLVI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Corrientes, 2014.

“Efecto de la administración crónica de *Phlegmariurus saururus* sobre la conducta sexual de la rata macho”. **Birri, M.**, Bruenner, S., Vallejo, M., Donadio, A.C., Carro Juárez, M., Agnese, M. XVIII Reunión de la comisión Permanente y XII Asamblea general de la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética. Córdoba, 2015.

“*Phlegmariurus saururus* produce actividad ansiolítica”. **Birri, M.**, Ortega-Munive, H., Vallejo, M., Carro Juárez, M., Agnese, M. XVIII Reunión de la comisión Permanente y XII Asamblea general de la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia. VI

Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética. Córdoba, 2015.

“*Phlegmariurus saururus* no afecta la actividad motora y produce efecto ansiolítico”. **Birri, M.**, Vallejo, M., Carro Juárez, M., Agnese, M. XVIII Reunión de la comisión Permanente y XII Asamblea general de la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética. Córdoba, 2015.

“El extracto alcaloidal de *Phlegmariurus saururus* facilita la eyaculación en ratas espinalizadas”. **Birri, M.**, González, L.R., Vallejo, M., Carro Juárez, M., Agnese, M. V Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales. I Jornadas Nacionales de Plantas Medicinales Nativas. Esquel, Nov. 2016.

“Sauroxina facilita la conducta sexual de la rata Wistar macho”. **Birri, M.**, Hernández-Hernández, F., Vallejo, M., Ortega, G., Carro-Juárez, M., Agnese, M. V Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales. I Jornadas Nacionales de Plantas Medicinales Nativas. Esquel, Nov. 2016.

Publicaciones Científicas con referato

Huperzia saururus Lam. Trevis. (Lycopodiaceae) facilitates ejaculation in spinal cord transected male rats (2014). **Birri, M.**, Franco, M.A., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese, M. Journal of Ethnofarmacology, 157, 38-44.

Aphrodisiac activity of *Phlegmariurus saururus* in copulating and noncopulating male rat (2017). **Birri, M.**, Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese, M. Phytomedicine, 24, 104-110.

Adicionalmente, se encuentran en redacción otros 4 trabajos.

Anxiolytic activity of *Phlegmariurus saururus* decoction. **Birri, M.**, Hernández-Hernández, E., Vallejo, M., Carro-Juárez, M., Agnese, M.

Prevalencia de comercialización de *Phlegmariurus saururus* y análisis de sus alcaloides. **Birri, M.**, Vallejo, M., Cabral Pérez, M., Ortega, G., Agnese, M.

Phlegmariurus saururus aphrodisiac effect on adult male rats at repeated doses. **Birri, M.**, Bruenner, S., Vallejo, M., Donadío, A.C., Carro Juárez M; Agnese AM.

Alkaloid extract of *Phlegmariurus saururus* induces prosexual effects in Wistar male rats. **Birri M.**, Vallejo M, Carro Juárez M, Agnese M.