

CAMBIOS RESPIRATORIOS Y BRONCOPULMONARES OBSERVADOS EN ANIMALES QUE RECIBIERON POLIPODIUM LEUCOTOMOS

*Dr Pablo J. Cambar, Dr. Pedro R. Portillo,
Dra. Isabel le Seaman*, Dr. Ricardo
Bulnes** y Dr. Virgilio Cardona****

Los autores son profesores del Depto, de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Ciencias Médicas.

I NTRODUCCION

Las fracciones hidro y liposolubles obtenidas de los rizomas y de las hojas del helecho *Potipodium leucotomos* se han usado para el tratamiento de la soriasis, osteoartritis y dermatitis atópica, con resultados favorables. (1, 2, 3). La exploración fotoquímica de los extractos de calaguala ha revelado que contienen gran cantidad de sustancias químicas: carbohidratos, flavonoides, saponinas, terpenos, triterpenos, viscianinas, Calcio, Magnesio, Potasio, otros minerales y muchos grupos químicos. Se ignora exactamente cuál entre los grupos identificados es el activos, desde el punto de vista farmacológico.

Los extractos purificados de la calaguala han producido a nivel bioquímico efectos anti anabólicos en tejido tumoral humano (4); también aumentó la producción de fibroblastos y de colágeno en la piel de ratas y de pacientes psoriáticos (5, 6, 7); incrementó transitoriamente la producción de linfocitos T supresores en humanos (8).

La presente investigación fue dirigida a determinar si la calaguala produce cambios funcionales o tisulares

de aparato respiratorio a un nivel preclínico, como parte del cernimiento farmacológico general de este helecho. En este trabajo se observó cierto grado de variabilidad entre las especies estudiadas. La fracción Cf4 obtenida de *Poli podium leucotomos* produjo bronco dilatación leve en los perros y bronco constricción mas hipertensión pulmonar en conejos. La fracción Cf4 incrementó la respuesta hipotensora producida por la inyección de histamina exógena en ratas y aumentó la respuesta bronco constrictora evocada en conejo por dicha anima. El extracto de *Poli podium leucotomos* disminuyó la respuesta hipotensora y la taquipnea producida por prostaglandina E1; Cf4 también incrementó ligeramente la taquipnea producida por la inyección I.V. de serotonina. Debido al contenido iónico del extracto u otros factores, las respuestas de los anillos traqueales de cobayo no fueron muy consistentes.

En los estudios toxicológicos subagudos, en las ratas tratadas predominaron el edema y la congestión pulmonar. En los estudios toxicológicos crónicos predominaron las bronquitis, y atelectasis pulmonares en los grupos tratados con la fracción hidrosoluble Cf4 de calaguala. No todos los cambios pueden deberse a factores extrínsecos, por lo que se recomienda tener mucho cuidado con las personas que adolecen de afecciones alérgicas, ya que aparentemente Cf4 podría aumentar los efectos funcionales de la histamina, al menos inicialmente.

* Asesores de CID-CONRAD
** Depto. de Oncología, Facultad de Ciencias Médicas
*** Depto. de Patología, Facultad de Ciencias Médicas

MATERIAL Y MÉTODOS

RESPIRACIÓN EN RATAS ANESTESIADAS QUE RECIBIERON $Cf_4 + Cf_3$ POR VÍA INTRAGÁSTRICA

Se usaron ratas wistar que fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a la dosis de 50 mg/kg por vía I.P. Las ratas fueron preparadas para medir presión arterial en la carótida derecha. Se registró pneumografía de impedancia y electrocardiografía en derivación II, por medio de electrodos de aguja y con un fisiógrafo CPM de Narcobio—Systems para medir todos los parámetros arriba señalados. Se introdujo un tubo de polietileno por vía oral hasta el estómago, para inyectar las fracciones hidro y liposoluble ($Cf_4 + Cf_3$) de *Polypodium leucotomos* a las dosis de 60 y 180 mg/Kg. La proporción de la mezcla de las fracciones fue de 99o/o a 1o/o, respectivamente; como control se administró aceite de oliva por vía I.G. a la dosis de 0.05 cc/100g de peso corporal.

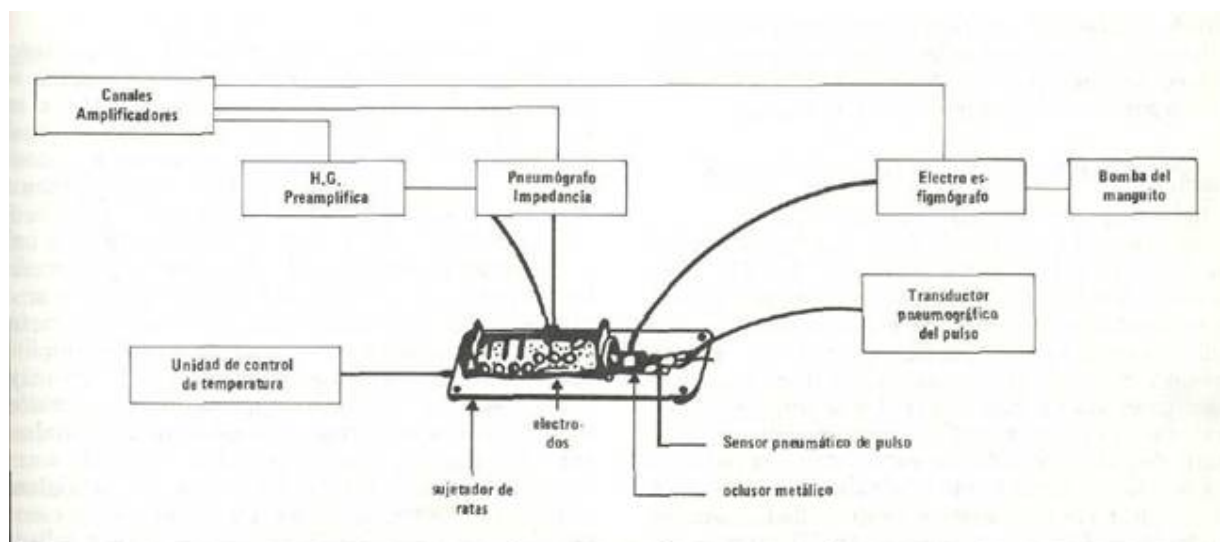
FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS SIN ANESTESIA QUE RECIBIERON UNAMEZCLA DE LAS FRACCIONES $Cf_4 + Cf_3$ OBTENIDAS DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS

Se usaron 8 ratas wistar mantenidas en ayunas 12 horas antes del experimento, pero sin restringir

líquidos. Para medir la presión arterial sistólica, la pneumografía de impedancia y electrocardiografía, usamos la unidad de estudio para animales pequeños, desarrollada por Narco Bio-Systems Inc. Texas, E.U., que consiste en una base termo-regulable, a la que se atornilló una jaula de lucita para confinar en su interior a la rata. La base está acoplada a una unidad de control de temperatura que permite elevar la misma lo suficiente para que el animal use su cola como mecanismo adicional de disipación de calor promoviendo la circulación sanguínea en ella. Para medir la presión arterial se ocluyó la circulación de la cola con un manguito anular y se detectó que el pulso periférico fue apareciendo conforme la presión del manguito. La presión en la que el primer pulso aparece es una medida de la presión sistólica de la rata. La respiración fue registrada por medio de un acoplador para pneumografía de impedancia. Los electrodos de aguja fueron insertados por vía subcutánea en el tórax y fijados con esparadrapo. El cable de extensión de los electrodos de aguja se conectaron a la entrada del acoplador de pneumografía de impedancia y la respiración registrada. Un acoplador de alta ganancia permitió el registro del electrocardiograma. (Ver Diagrama 1).

Todos los parámetros, incluyendo en varias ocasiones la temperatura, fueron registrados por un

DIAGRAMA 1 UNIDAD DE ESTUDIO DE ANIMALES PEQUEÑOS



fisiógrafo Narco-Biosystem modelo CPM, Texas. Se usó aceite de oliva por vía oral para control a la dosis de 0.05 cc/100g de peso corporal, la emulsión de Cf4 * Cf3 en proporción de 99o/o al lo/o se administró por vía oral a las dosis acumulativas de 60 y 180 mg/kg de peso corporal.

FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS ANESTESIADAS QUE RECIBIERON Cf, POR VIA I.V.

Un grupo de 5 ratas adultas fueron anestesiadas con dial uretano. Se cateterizó la vena femoral derecha. Se implantaron electrodos de aguja en el tejido celular subcutáneo para media pneumografía de impedancia con un polígrafo Narco-Biosystem modelo CPM, Texas. Se inyectó Cf4 a las dosis de 10, 30 y 100 mg/Kg I.V., el pH de la fracción era de 4.5 (recordar que cuando son muy ácidos pueden producir cambios por estímulo de quimiorreceptores).

FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS SIN ANESTESIAS QUE RECIBIERON *Poli podium leucotomos* DURANTE 16 SEMANAS

Se usaron 48 ratas wistar destinadas a un estudio de toxicología crónica que fueron divididas en 8 grupos, de acuerdo a sexo, controles (almidón más agua) y con sus correspondientes grupos de ratas tratadas con Cf4 a las dosis de 250 y 500 mg/Kg de peso corporal. Se empleó la unidad para el estudio de animales pequeños, desarrollada por Narco-Biosystem Inc. Texas, EU. El procedimiento de medición ha sido descrito en este artículo. Las ratas fueron tratadas ininterrumpidamente durante 16 semanas antes de proceder a estudiar la frecuencia respiratoria. A las 24 semanas se sacrificaron para investigaciones histopatológicas.

SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO Y AUTOCOIDES

Se usó un grupo de ratas wistar en las que se inyectó por vía I.V. acetilcolina 5ug/Kg o adrenalina 2.5 ug/Kg I.V. antes y después de Cf4 * Cf3 obtenido de *Poli podium leucotomos* administrado oralmente a las dosis de 60 ó 180 mg/Kg. Se midió en estas ratas la presión arterial en la arteria carótida derecha, la frecuencia cardiaca por electrocardiografía en derivación II y la frecuencia respiratoria por pneumografía de impedancia. En otro grupo de ratas también se estudiaron los parámetros señalados, inyectando adrenalina o acetilcolina 5 ug/kg por vía I.V. antes y después de la fracción hidrosoluble Cf4. En un grupo de 10 ratas se in-

yectó di clorhidrato de histamina a la dosis de 0.5, 1, 2, 4 y 8 ug/kg I.V. antes y después de la administración de Cf4 a la dosis de 100 mg/kg I.V.

En un grupo de 5 ratas se inyectó serotonina a la dosis de 10 mg/Kg I.V., antes y después de la administración de Cf4 a la dosis de 100 mg/Kg I.V.

Un grupo adicional de 6 ratas recibió prostaglandina El a la dosis de 5, 10 y 20 ug/Kg I.V. antes y después de Cf4 (100 mg/kg I.V.).

En estos grupos, además de presión arterial, frecuencia cardiaca, se midió la respiración por pneumografía de impedancia. El registro de los parámetros aludidos se logró usando un fisiógrafo de Narco-Biosystem CPM.

En un grupo de 3 perros se investigó la influencia de Cf4 100 mg/Kg en las respuestas típicas producidas por adrenalina 10 ug'kg, oclusión carótida por 30 segundos o estimulación vagal por 8 segundos.

MECÁNICA RESPIRATORIA EN PERROS

En perros para administrar la droga se canuló la vena femoral derecha y se insertó otro tubo de polietileno en el estómago. La fracción hidrosoluble Cf4 se administró a las dosis de 1, 10 y 30 mg'kg. La temperatura corporal de los animales se mantuvo por medio de un colchón térmico hospitalario. Cuando hubo necesidad de respiración artificial se usó una bomba respiratoria Harvard.

Perros anestesiados. Volúmenes y propiedades mecánicas del pulmón. Para esta investigación se usaron ocho perros con pesos comprendidos en el rango de 5 y 16 Kg. Para anestesarlos se usó pentobarbital sódico por vía intravenosa a la dosis de 30 mg/Kg. La tráquea fue cuidadosamente disecada y canutada, el tubo traqueal se conectó a un pneumotacógrafo Fleisch número uno. Se usó un transductor diferencial PT 5 (Grass) para medir la diferencia de presión del aire cuando el mismo atraviesa las resistencias especiales del pneumotacógrafo. La señal fue transmitida a un preamplificador 5 P; también fue necesario similar montaje para medir el volumen respiratorio. La presión interpleural se registró por medio de un transductor PT 5 (Grass), uno de sus lados conectado a una cánula interpleural especial hecha de plexiglás, perforada con varios agujeros y dotada de un cierre circular con rosca que permite mantener sellada

la piel alrededor del lugar de inserción (séptimo espacio intercostal izquierdo), la otra cámara se conectó a la tráquea. Los valores fueron obtenidos directamente del registro hecho en un polígrafo Grass modelo 5 D.

MECÁNICA RESPIRATORIA EN CONEJOS ANESTESIADOS

Se usaron 5 conejitos machos, cuyo peso osciló entre 2.35 y 2.94 Kg, fueron anestesiados con pentobarbital sódico a la dosis de 30 mgs/Kg, 45 minutos después se inyectaron otros 20 mg/Kg y a intervalos de 45 a 60 minutos de 5 a 10 mg/kg adicionales para obtener una adecuada anestesia quirúrgica. Se les practicó una traqueotomía en la que se introdujo un tubo en T y se conectó a un pneumotacógrafo Fleisch No. 000, y a un transductor de baja presión PT 5 de Grass cuya señal pasó a un preamplificador 7 Pi. El flujo fue integrado electrónicamente, mediante un integrador Grass 7 P10B para obtener el volumen ventilatorio o en ondas. El extremo libre del tubo en T se conectó a una cámara del transductor Grass PT5; a la otra cámara

del mismo se conectó a un catéter adicional insertado en el quinto espacio intercostal derecho. Ello permitió, con el auxilio de un preamplificador 7 P 1, medir la presión transpulmonar. (Ver diagrama 2). El cálculo de la resistencia y adaptabilidad pulmonar se hizo gráficamente, de acuerdo al método descrito por Amdur y Mead (9). Con un preamplificador Grass 7 P4 y electrodos de platino se obtuvo un electrocardiograma y con dos transductores Grass P23DC se midió la presión arterial, y la presión venosa central por medio de la arteria femoral y la vena yugular externa derecha. Se usó un polígrafo Grass 7D para registrar los parámetros respiratorios y cardiovasculares señalados. La Calaguala (Cf) se administró I.G. a las dosis de 50, 100, 200 y 400 mg/kg.

Cadena traqueal de cobayos. Se usaron varios cobayos, cuyos pesos oscilaron entre 200 y 300 gm, fueron sacrificados por un golpe en la cabeza y decapitados al nivel más alto posible. La tráquea se disecó cuidadosamente y se trasladó a un disco de Petri que contenía solución de Krebs oxigenada;

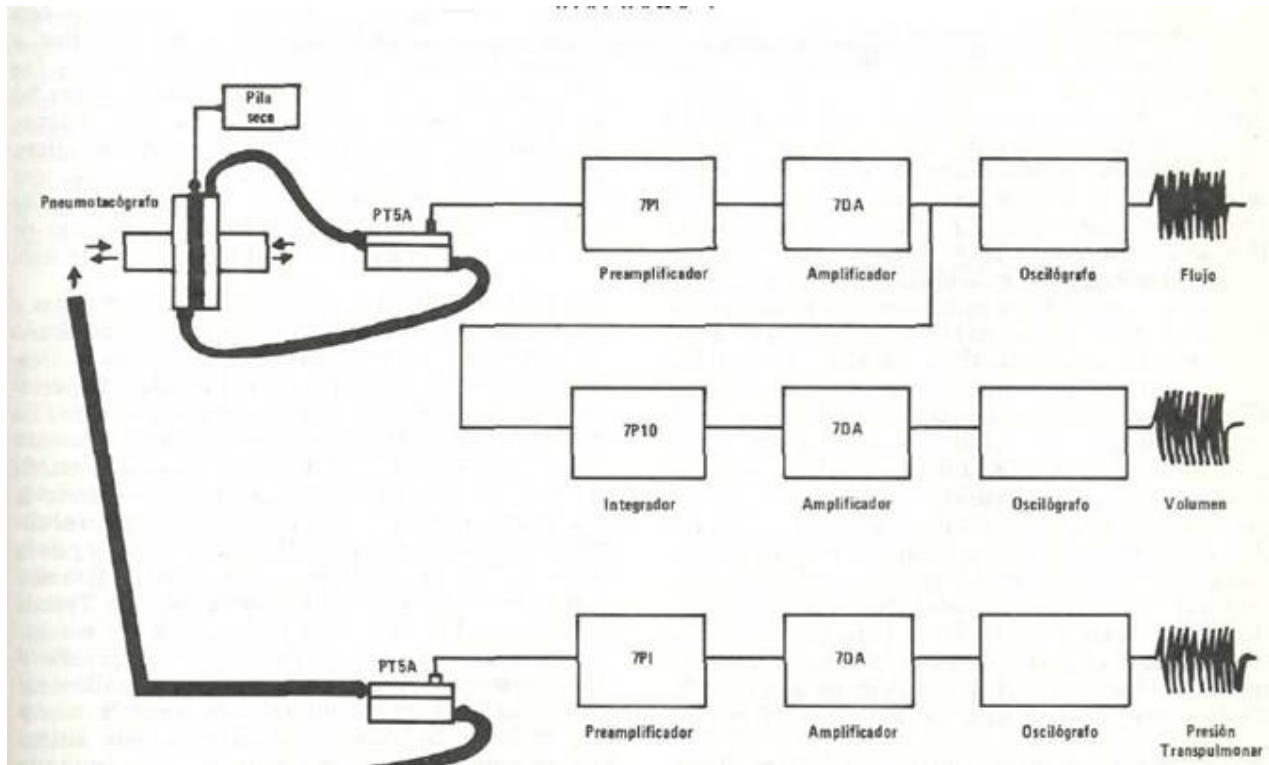


DIAGRAMA 2 ESTUDIO DE LOS VOLÚMENES Y PROPIEDADES MECÁNICAS PULMONARES EN EL CONEJO

la tráquea fue cortada transversalmente entre los segmentos de cartílago para obtener varios anillos de músculo traqueal (usualmente doce) se unieron con hilo para formar una cadena. Las mismas se montaron en un sistema de baños para tejidos aislados (Metro Scientific Inc.) que contenía solución de Krebs a 37°C aireada con una mezcla de oxígeno (95o/o) y dióxido de carbono (5o/o). El sistema de baños se mantuvo a una temperatura constante mediante una bomba termostática Haake. Uno de los extremos de la cadena se fijó al tubo de vidrio oxigenador y el otro a un transductor de desplazamiento-fuerza modelo PT 03 (Grass) y la tensión muscular isométrica fue registrada en un polígrafo Grass modelo 5 D. La tensión de reposo fue de 1g a través de todo el experimento. La solución de Krebs-bicarbonato tenía la siguiente composición (concentraciones milimolares): NaCl, 117; KCl, 4.75; CaCl₂, 2.83; KH₂PO₄, 1.19; MgSO₄, 1.19; NaHCO₃, 24.6; y glucosa, 5(2). Para producir contracción de la cadena traqueal se usó Histamina 10-4M La droga se usó a las dosis de 10, 100 y 200 ug/cc. Se usó (—) adrenalina a la dosis de 10 ug/cc para ensayar actividad antiespasmódica y para comparar resultados.

Conejos anestesiados. Presiones en el circuito pulmonar. Para esta investigación se usaron conejos cuyos pesos estaban comprendidos en el rango de 1.6 y 2.5 Kg. Para anestesiarnos se usó una mezcla de dial-uretano inyectada en la vena de la oreja. La tráquea fue cuidadosamente disecada y se insertó un tubo endotraqueal metálico, uno de cuyos extremos se conectó a una bomba respiratoria Harvard, cuya frecuencia y volúmenes se ajustaban a las características individuales de cada animal, por lo general a 38 por minuto y a un volumen respiratorio de 50 cc ajustable en la rama lateral del tubo endotraqueal. El tórax se abrió en la línea media, se removió tejido pericárdico y a continuación se insertó un catéter de polietileno en la aurícula izquierda, otro catéter dotado de una aguja se introdujo en la arteria pulmonar. Los catéteres se conectaron a dos transductores electromagnéticos Statham modelo P 23 DC. Para medir la fuerza de contracción de una sección del miocardio y la frecuencia cardíaca se usó un arco de Walton. Para registrar los parámetros antes descritos se usó un polígrafo Grass Modelo 5D. Para la administración de las drogas se cateterizó la vena femoral derecha. La fracción Cf₄ se disolvió en solución de Krebs y se ensayaron las dosis de 1, 10 y 30 mg/kg.

Perfusión de pulmón aislado de rata. Se usaron cinco ratas de 250 gramos. Los animales se sacrificaron

golpeándoles la cabeza. Se seccionaron las costillas, lo más lateralmente posible y se levantó el peto costal, se disecó la tráquea. Se aislaron los pulmones y el corazón. Se introdujo una cánula en la arteria pulmonar principal y fue sujeta mediante una ligadura de seda. La tráquea, previa canulación, se conectó a una bomba respiratoria para roedores (Harvard), el volumen respiratorio se ajustó a 4 cc y la frecuencia a 60 por minuto.

Los pulmones de las ratas fueron perfundidos a través de la arteria pulmonar con solución de Tyrode, por medio de una bomba de perfusión Watson Marlow. La velocidad de flujo se incrementó progresivamente desde cero hasta obtener un flujo constante de 5 ml por minuto. La presión del flujo del líquido dirigido a la arteria pulmonar ("presión de la arteria pulmonar") fue medida por un manómetro electromagnético Statham P23 DC, cuyas señales pasaron a un polígrafo Grass Modelo 5D donde se realizó un registro continuo de las variaciones de presión. El líquido que se perfundió desde la arteria pulmonar circuló libremente por los pulmones y salió a través de una incisión que separó los ventrículos a nivel atrio ventricular. El líquido de perfusión fue oxigenado con una mezcla de oxígeno (95o/o) y CO₂ (5o/o) y se hizo circular a través de un serpentín con camisa de vidrio y fue mantenido a una temperatura de 40°C por medio de una bomba termo regulara Haake. Los pulmones estaban encerrados en una cámara de plexiglás, cuyo fondo en forma de embudo permitía recoger y medir continuamente el volumen de líquido de perfusión proveniente del pulmón y en lugar de recircularlo se eliminó todo el líquido que se usó.

Las presiones de perfusión iniciales fueron bajas y proporcionales al flujo que se estimó necesario mantener para no provocar edema pulmonar. Ocasionalmente se agregó dextrán al líquido de perfusión. La fracción Cf₄ fue disuelta en Tyrode. La inyección de la droga se hizo utilizando el menor volumen posible de líquido con una aguja insertada en el tubo del líquido de perfusión, evitando la producción de cambios bruscos de presión en el circuito. Se usaron dosis de 25, 50, 75 y 100 ug de la fracción Cf₄. Se comparó el efecto de la fracción con el de inyecciones equivalentes de Tyrode o C¹²Ca al 15o/o. Para el cómputo de los resultados se estimó la relación de cambios de presión y flujo a un nivel de la arteria pulmonar propiamente y del flujo de líquido que salía de los pulmones y la presión de la arteria pulmonar (en este último caso se asumió que la presión directriz era igual a la de la arteria pulmonar, dado que estaba escindido

el corazón a nivel atrio-ventricular). El método se ensayó con varias drogas: histamina, serotonina y adrenalina.

TOXICOLOGIA SU BAGUDA DE Cf₄. ADMINISTRACIÓN Decf₄ EXTRAÍDO DE *Poli podium leucotomos* por 20 DÍAS

Se usaron 60 ratas de la cepa Wistar que fueron divididas por sexo y tipo de tratamiento recibido: solución salina isotónica (0.01 cc/Kg) ó Cf₄ a la dosis de 500 mg/Kg. Este estudio se consideró preliminar, debido a la escasez de recursos; por la necesidad de conocer en detalle la histología pulmonar de las ratas controles, estos últimos grupos fueron abundantes.

Las ratas fueron tratadas por un período interrumpido de 20 días, la mitad recibieron su tratamiento por vía subcutánea y la otra mitad por vía oral. Se mantuvieron en jaulas metabólicas y alimentadas con purina *ad libitum* y agua potable. Las ratas se pesaron al inicio y al final del período de experimentación, midiéndose diariamente ingestas y excretas, y evaluándose diariamente su estado general. A los 20 días de estudio, las ratas fueron sacrificadas con un golpe en la nuca y se les seccionaron los vasos del cuello. A cada una de ellas se les practicó autopsia y la mayoría de sus tejidos fueron pesados y fijados en formalina al 10o/o. Se enviaron al Departamento de Patología los siguientes tejidos: Pulmones, hígado, riñones, corazón, bazo, suprarrenales, testículos, cerebro, ovarios, huesos, músculo y piel. En este trabajo se discuten solamente los estudios pulmonares con Cf₄.

TOXICOLOGIA CRÓNICA. ADMINISTRACIÓN DE CF. EXTRAÍDO DE POLYPODIM LEUCOTOMOS POR 24 SEMANAS

Se usaron 48 ratas Wistar divididas por sexo y por grupos, según tratamiento recibido: Almidón + agua ó fracción hidrosoluble Cf₄ del *Poli podium leucotomos*, a las dosis de 250 y 500 mg/Kg por vía oral, por un período interrumpido de 24 semanas. Se les practicaron exámenes de hematología y química sanguínea, presión arterial sistólica, frecuencia cardíaca y respiración a los 4 meses de tratamiento. Diariamente se evaluó su estado general, ingestas y excretas, peso corporal, etc. Las ratas fueron estudiadas en jaulas metabólicas individuales y alimentadas con concentrado de rata elaborado por FENALCO y agua potable filtrada. Al final de las 24 semanas de experimentación se hicieron estudios bioquímico-clínico de todos los animales y fueron sacrificados por decapitación, usando

una guillotina Harvard especial para ratas.

A cada una se les practicó autopsia y la mayoría de los tejidos fueron pesados y fijados en una solución de formalina al 10o/o. Con un código de identificación se enviaron muestras al laboratorio de Patología, los siguientes tejidos: Cerebro, ojos, tiroides, hígado, vesícula biliar, pulmones, riñones, corazón, bazo y suprarrenales. Se discuten en este trabajo los hallazgos pulmonares.

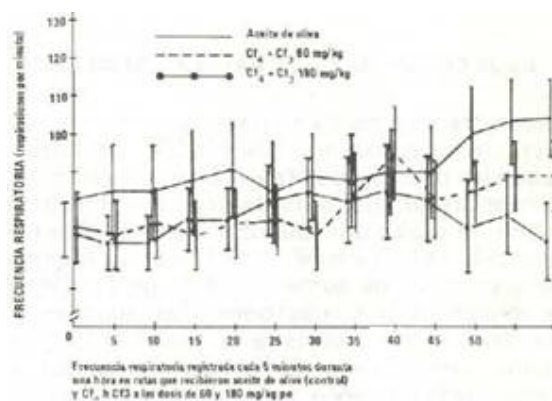
RESULTADOS

FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS ANESTESIADAS QUE RECIBIERON Cf₄ + Cf₃ DE *Poli podium leucotomos*

Se observó cierta tendencia a la reducción de la frecuencia respiratoria, cuando las ratas recibieron las fracciones hidro y liposolubles de *Poli podium leucotomos* a las dosis de 60 y 180 mg/Kg por vía I.G. Sin embargo, los cambios no son prominentes. Ver gráfico 1.

GRÁFICO 1

FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS ANESTESIADAS QUE RECIBIERON UNA MEZCLA DE LAS FRACCIONES HIDRO Y LIPOSOLUBLES Cf₄ Y Cf₃ DE POLYPODIM LEUCOTOMOS



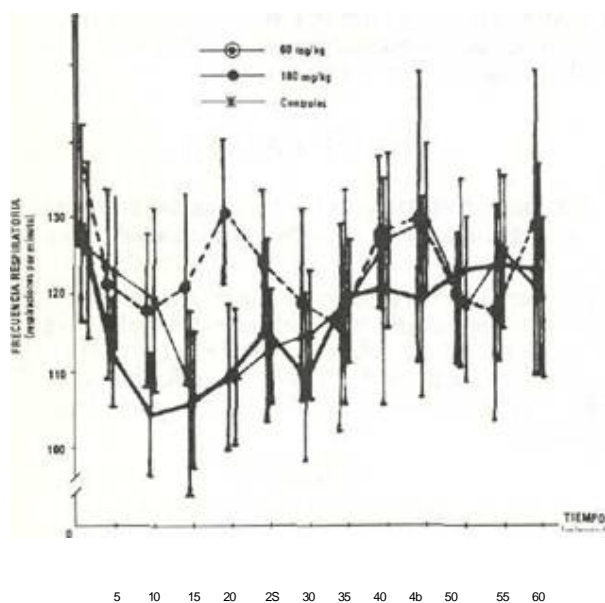
FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS INTACTAS. Cf₄+Cf₃

Después de que las ratas recibieron una mezcla de las fracciones hidro y liposolubles obtenidas del helecho *Poli podium leucotomos*, a las dosis de 60 y 180 mg/kg por vía oral, se observó cierta tendencia a la reducción de la frecuencia respiratoria de breve duración, pero luego las lecturas

son prácticamente iguales a los controles (aceite de oliva 0.05 cc/100g de peso corporal). Ver gráfico 2.

GRÁFICO 2

FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS INTACTAS QUE RECIBIERON UNA MEZCLA DE LAS FRACCIONES HIDRO Y LIPOSOLUBLES Cf₄ Y Cf₃ DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS



EFFECTOS DE Cf₄ POR VÍA I.V. EN RATAS ANESTESIADAS

La administración de Cf₄, fracción hidrosoluble de *Poli podium leucotomos* por vía I.V. en términos generales produjo dos fases: una de bradipnea usualmente inicial, que dura de unos 5 a 10 segundos y otra de taquipnea final. En algunos casos no se observó la fase inicial de bradipnea. La taquipnea se acompañó de aumento de la profundidad de los movimientos respiratorios. Casi siempre al minuto después de inyectada la fracción Cf₄, la respiración comienza a normalizarse, aunque a veces esto tarda un poco más. Los cambios respiratorios inducidos por la fracción en 1974 son casi idénticos a los observados en 1985, o sea que con el tiempo, a pesar de algunos cambios de las formas de extracción de Cf₄ la respuesta biológica se mantiene constante. (Ver cuadro 1.).

FRECUENCIA RESPIRATORIA EN RATAS SIN ANESTESIAS QUE RECIBIERON *Poli podium leucotomos* (Cf₄) DURANTE 16 SEMANAS

Excepto con la dosis de 500 mg/Kg de Cf₄ en las

ratas machos, la frecuencia respiratoria fue ligeramente superior en los grupos tratados, comparados con los controles, sin embargo, los cambios no fueron estadísticamente significativos. (Ver cuadro 2).

CUADRO 1

EFFECTOS RESPIRATORIOS PRODUCIDOS POR LA FRACCIÓN Cf₄ DE POLYPODIUMLEUCOTOMGS EN RATAS ANESTESIADAS

PROCEDIMIENTO (NUMERO DE INYECCIONES)	FRECUENCIA RESPIRATORIA (RESPIRACIONES POR MINUTO)		
	CONTROL	FASE I Δ ₁ %	FASE II Δ ₂ %
Cf ₄ 10 mg/kg I.V. (11)	100 ± 6.8	- 25.6 ± 7.5 (en 8 casos)	+ 9.3 ± 1.5 (en 8 casos)
Cf ₄ 30 mg/kg I.V. (10)	98.3 ± 2.6	- 30 ± 9.7 (en 8 casos)	+ 17.8 ± 4.7 (en 8 casos)
Cf ₄ 160 mg/kg I.V. (10)	92.4 ± 6.3	- 22 ± 5.8 (en 7 casos)	+ 14.04 ± 3.1 (en 8 casos)

La administración de Cf₄ por vía I.V. produjo dos fases: una de bradipnea usualmente inicial y otra de taquipnea final. En algunos casos no se observaron las 2 fases, se usaron 8 ratas. Los resultados se presentan como promedio y 1 error standard de la media.

Polypodium leucotomos Cf ₄ por 4 meses (D O S I S)	PROMEDIO Y 1 ERROR STANDARD DEL PROMEDIO	
	FRECUENCIA RESPIRATORIA (RESPIRACIONES POR MINUTO) B A S A L	
Ratas hembras		
Controles oral	115 ± 2.11	
Cf ₄ 250 mg/kg oral	119 ± 3.26	P < 0.3
Controles oral	129 ± 1.72	
Cf ₄ 500 mg/kg oral	134 ± 1.43	P < 0.1
Ratas machos		
Controles oral	117 ± 8.86	
Cf ₄ 250 mg/kg oral	127 ± 4.1	P < 0.3
Controles oral	127 ± 3.6	
Cf ₄ 500 mg/kg oral	119 ± 9.96	P < 0.4

SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO Y AUTACOIDES

Acetilcolina y Adrenalina I.V.

La inyección de acetilcolina (5 ug/kg I.V.) incrementó la frecuencia y la profundidad de los movimientos respiratorios; la adrenalina (5 ug/kg I.V.) produjo una respiración irregular, lenta inicialmente, después rápida y superficial y al final mas profunda, pero siempre irregular. La administración de las Fracciones Cf₄ * Cf₃ por vía intra gástrica (60 y 180 mg/kg) aparentemente no modificó la

CUADRO 4 EFECTO DE LA FRACCIÓN CU

SOBRE LAS RESPUESTAS A INYECCIONES I.V.

DE ADRENALINA, ACETILCOLINA. OCLUSIÓN CAROTÍDEA BILATERAL Y ESTIMULACIÓN VAGAL EN PERROS

PROCEDIMIENTO (DOSIS O DURACIÓN)	FRECUENCIA RESPIRATORIA* (RESPIRACIONES POR MINUTO)	
	CONTROL	Δe/o
Adrenalina 10 mg/kg I.V.	6 ± 1.73	- 10.7 ± 5.8
Adrenalina después Cf4 100 mg/kg I.V.	5.2 ± 0.2	- 4.5 ± 8.2 N.S.
Acetilcolina 10 mg/kg I.V.	7.0 ± 1	+ 20.7 ± 10.0
Acetilcolina después de Cf4 100 mg/kg I.V.	9.3 ± 2.0	+ 30.3 ± 9.34 N.S.
Oclusión carotídea 30 segundos	7.0 ± 1.1	+ 34 ± 11.6
Oclusión carotídea después de Cf4 100 mg/kg I.V.	6.6 ± 0.43	+ 31 ± 15.11 N.S.
Estímulo vagal 8 segundos	9.0 ± 2.9	+ 12.0 ± 7.23
Estímulo vagal después de Cf4 100 mg/kg I.V.	9.8 ± 2.0	+ 7.16 ± 4.67 N.S.

Los resultados se presentan como promedio y ± error standard de la media

Volúmenes respiratorios

La fracción Cf4 administrada por vía intra gástrica o intravenosa produjo un ligero aumento del volumen respiratorio normal, concomitantemente se produjo un incremento de la frecuencia respiratoria que fue más evidente cuando se administró la droga ala dosis de 30 mg/Kg por vía intravenosa.

El aumento de la frecuencia respiratoria se produjo por cualquier vía de administración. Cuando Cf4 se dio por vía intravenosa, en algunas ocasiones la hiperpnea iba precedida de un breve periodo de apnea. La hiperpnea disminuyó cuando se practicó vagotomía bilateral a nivel cervical por debajo del punto de bifurcación de la arteria carótida primitiva. Debido a aumento del volumen respiratorio (Tidal) y de la frecuencia respiratoria, se produjo un incremento del volumen respiratorio minuto.

Resistencia pulmonar

Se produjo una ligera disminución de la resistencia cuando se administró Cf4. ya sea por vía oral o

CUADRO 5-A EFECTOS BRONCOPULMONARES DE POLYPODIUM LEUCÓTOMGS ADMINISTRADO POR VIA INTRAGASTRICA A PERROS ANESTESIADOS

DOSIS DE Cf4 I.G. (mg/kg)	NUMERO DE PERROS (NUMERO DE INYECCIONES)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO									
		FLUJO RESPIRATO- RIO (cc/kg)		VOLUMEN RESPIRA- TORIO (cc)		PRESION TRANSPUL- MONAR (cm/H ₂ O)		RESISTENCIA AE- REA (cmH ₂ O/lts/s)		FRECUENCIA RESPI- RATORIA (resp/min)	
		CONTROL	Δe/o	CONTROL	Δe/o	CONTROL	Δe/o	CONTROL	Δe/o	CONTROL	Δe/o
1	5 (5)	236	- 3.1	480	- 3.20	5.16	- 15.6	0.021	- 12.3	18.3	+ 16.8
		± 29.3	± 6.47	± 40.07	± 5.56	± 0.50	± 8.6	± 0.003	± 4.47	± 3.25	± 3.5
10	6 (6)	241	+ 4.3	548	+ 7.25	5.3	- 12.5	0.026	- 7.1	19.1	+ 14
		± 48.6	± 6.30	± 58.5	± 6.39	± 0.77	± 6.81	± 0.01	± 5.25	± 2.58	± 6.67
30	5 (5)	210	+ 2.4	450	+ 7	6.8	- 6.4	0.035	- 10.8	27.4	+ 10.4
		± 33.8	± 5.32	± 50.1	± 12	± 0.59	± 5.54	± 0.005	± 7.59	± 4.26	± 6.95

CUADRO 5-B EFECTOS BRONCOPULMONARES DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA A PERROS ANESTESIADOS

DOSIS DE Cf4 I.G. (mg/kg)	NUMERO DE PERROS (NUMERO DE INYECCIONES)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO									
		FLUJO RESPIRATO- RIO (cc/kg)		VOLUMEN RESPIRA- TORIO (cc)		PRESION TRANSPUL- MONAR (cm/H ₂ O)		RESISTENCIA AEREA (cmH ₂ O/lts/s)		FRECUENCIA RESPI- RATORIA (resp/min)	
		CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%
1	3 (3)	280	5	483	2	5.5	2.66	0.020	10.83	16	1.66
		± 90.28	± 2.92	± 72.73	± 4.07	± 1.32	± 1.68	± 0.0033	± 1.77	± 2.0	± 4.60
10	5 (5)	235	0.4	480	4.9	6.2	6.8	0.031	18.5	24.8	18.5
		± 46.84	± 3.32	± 51.6	± 6.44	± 1.14	± 5.02	± 0.01	± 5.45	± 5.49	± 8.14
30	6 (6)	231	6.6	483	2.5	5.8	8.58	0.028	0.2	29	34.66
		± 36.42	± 5.60	± 16.73	± 7.96	± 0.47	± 2.89	± 0.004	± 4.39	± 4.88	± 21.50

CUADRO 5-C

EFECTOS BRONCOPULMONARES DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS ADMINISTRADO POR

VÍA INTRAGÁSTRICA O INTRAVENOSA A PERROS ANESTESIADOS

Cf ₄ (mg/kg)	NUMERO DE PERROS	RESISTENCIA (cmH ₂ O/lv/seg)*			
		VIA INTRAGÁSTRICA		VIA INTRAVENOSA	
		CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%
1	5	0.021 ± 0.0035	- 12.3 ± 4.47	0.0205 ± 0.0033	- 10.83 ± 1.776
10	6	0.026 ± 0.0109	- 7.166 ± 5.265	0.031 ± 0.010	- 18.5 ± 5.45
30	6	0.035 ± 0.005	- 10.6 ± 7.6	0.0284 ± 0.0049	- 0.2 ± 4.4

- Los resultados se presentan como promedio y ± error standard del promedio. Comparativamente no se observaron diferencias estadísticamente significativas (de student) cuando el extracto de *Poli podium leueotomos* se administró por cualquiera de las vías.

intravenosa. Es de hacer notar que el tono muscular de las vías aéreas no había sido incrementado previamente por drogas espasmo génicas del árbol traqueobronquial como histamina. La presión transpulmonar por lo general disminuyó y se produjo aumento aunque ligero del flujo de aire a través de las vías aéreas. Se necesitan más experimentos en condiciones de registro verdaderamente dinámicos para comparar los efectos de Cf4 con otras drogas.

Cadena traqueal de cobayo

Los experimentos realizados con la cadena traqueal de cobayo revelaron que dosis de 100 ug/cc produce una disminución del espasmo inducido por la administración de histamina. El efecto por lo general fue lento y débil, si se compara al de la adrenalina 10 ug/cc. Dosis repetidas de Cf4 producen taquifilaxis. Los efectos en la musculatura traqueal no tratada con espasmogénico fueron variables.

Volúmenes y mecánica respiratoria en conejos

Al inyectar la fracción hidrosoluble cf4 por vía I.G. a la dosis de 50, 100, 200 y 400 mg/Kg se observó cierta tendencia a incrementar la resistencia pulmonar, sin embargo la variabilidad fue tan grande que los cambios no fueron estadísticamente significativos.

Las modificaciones detectadas en lo atingente a flujo aéreo traqueal, volumen respiratorio, frecuencia respiratoria, presión transpulmonar y adaptabilidad pulmonar no fueron importantes

desde el punto de vista estadístico. (Ver cuadros 6-A, 6-B).

Después de la inyección de dosis pequeñas de histamina, la fracción Cf4 del *Poli podium leueotomos* administrada a las dosis de 50, 200 y 400 mg/Kg. por vía oral incrementó la resistencia pulmonar. A la dosis de 50 mg/kg I.V. de Cf4 la adaptabilidad pulmonar aumentó. (Ver cuadro 7-A, 7-B).

Circulación pulmonar

La siguiente serie de experimentos diseñada para tener una idea de los cambios que puede sufrir la circulación pulmonar, por la administración intravenosa de calaguala, comprendió experimentos in vivo e in Vitro para tratar de dilucidar los cambios de presiones en el circuito pulmonar.

Presiones del circuito pulmonar. Experimentos en conejos.

La administración de Cf4 a la dosis de 1 mg/kg de peso corporal por vía intravenosa no produjo ningún cambio en la presión de la arteria pulmonar, presión auricular izquierda y diferencial. Las dosis de Cf4 de 10 mg/kg por vía intravenosa, produjo cambios variables en las presiones del circuito pulmonar, predominando la dirección del cambio hacia el aumento. La dosis de Cf4 de 30 mg/kg por vía I.V. produjo incrementos en las presiones de la arteria pulmonar, de la aurícula izquierda y diferencial. A las dosis empleadas los cambios que se produjeron en la contractibilidad y frecuencia cardíaca fueron insignificantes, por ello es probable que el gasto cardíaco no sufriera cambios. (Cuadro 8).

CUADRO 6-A

VOLUMENES Y MECANICA DE LA RESPIRACION EN CONEJOS QUE RECIBIERON POR VIA I.G. FRACCION HIDROSOLUBLE DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS

DOSIS DE Cl ₂ I.G. (mg/kg)	NUMERO DE CONEJOS (NUMERO DE INYECCIONES)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO							
		FLUJO AEREO TRAQUEAL (ml/min)		VOLUMEN RESPIRATORIO (ml)		FRECUENCIA RESPIRATORIA (resp/min)		PRESION TRANSPULMONAR (cm H ₂ O)	
		CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%
50	5 (5)	322 ± 19.8	4.5 ± 4.5	20.9 ± 2.7	7.4 ± 3.97	73 ± 5.9	1.23 ± 6.0	5.1 ± 0.45	3.4 ± 4.3
100	5 (5)	308 ± 23.7	0.9 ± 5.1	21 ± 3.5	3.2 ± 3.4	76 ± 6.4	3.85 ± 0.4	5.1 ± 0.4	4.2 ± 4.3
200	5 (5)	204 ± 22.8	0.6 ± 2.7	20.1 ± 3.4	0.5 ± 3.2	74 ± 6.6	1.1 ± 3.2	5.0 ± 0.6	3.5 ± 2.1
400	5 (5)	208.4 ± 19.4	0.6 ± 3.8	19.9 ± 3.7	1.4 ± 2.41	72 ± 7.0	3.25 ± 2.4	5.1 ± 0.71	5.0 ± 4.0

Ninguno de los cambios observados fue estadísticamente significativo (t de student)

CUADRO 6-B

MECANICA DE LA RESPIRACION EN CONEJOS QUE RECIBIERON POR VIA I.G. FRACCION HIDROSOLUBLE DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS

DOSIS DE Cl ₂ I.G. (mg/kg)	NUMERO DE CONEJOS (NUMERO DE INYECCIONES)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO			
		RESISTENCIA PULMONAR (cm H ₂ O/ml/min)		ADAPTABILIDAD PULMONAR (ml/cm H ₂ O)	
		CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%
50	5 (4)	0.005 ± 0.0016	+55.0 ± 44.1	4.12 ± 0.5	+ 0.41 ± 12.1
100	5 (5)	0.0065 ± 0.002	+28.2 ± 24.1	3.9 ± 0.4	- 0.6 ± 3.7
200	5 (5)	0.0061 ± 0.0017	+27.1 ± 20.3	3.97 ± 0.5	- 0.8 ± 7.0
400	5 (5)	0.0065 ± 0.0017	+16.9 ± 33.2	3.78 ± 0.6	- 4.46 ± 7.0

Los cambios observados no fueron estadísticamente significativos (t de student)

CUADRO 7-A

VOLUMENES Y MECANICA DE LA RESPIRACION EN CONEJOS QUE RECIBIERON POR VIA I.G. LA FRACCION HIDROSOLUBLE DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS DESPUES DE HISTAMINA I.V.

DOSIS DE Cl ₂ I.G. (mg/kg)	NUMERO DE CONEJOS (NUMERO DE INYECCIONES)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO							
		FLUJO AEREO TRAQUEAL (ml/min)		VOLUMEN RESPIRATORIO (ml)		FRECUENCIA RESPIRATORIA (resp/min)		PRESION TRANSPULMONAR (cm H ₂ O)	
		CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%
50	5 (5)	298.2 ± 13.5	+ 6.5 ± 4.7	19.1 ± 3.26	+ 4.9 ± 2.14	76 ± 4.4	+ 4.1 ± 3.2	5.1 ± 0.6	- 6.3 ± 6.3
100	5 (5)	304.6 ± 11.9	- 3.4 ± 6.6	18.2 ± 3.2	- 6.4 ± 3.1	80 ± 5.8	+ 3.9 ± 5.1	4.5 ± 0.3	- 3.3 ± 4.4
200	5 (5)	291 ± 15.5	+ 5.3 ± 3.3	18.1 ± 3.0	- 2.2 ± 0.9	84 ± 5.6	3.6 ± 3.2	4.3 ± 0.4	- 1.4 ± 2.6
400	5 (5)	327.6 ± 15.7	+ 3.4 ± 3.4	18 ± 3.3	+ 1.2 ± 2.6	88 ± 7.0	- 3.5 ± 3.7	4.3 ± 0.36	+ 2.2 ± 1.4

CUADRO 9 EFECTOS DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS

SOBRE LOS PULMONES AISLADOS Y PERFUNDIDOS DE RATAS

DOSIS TOTAL DE LA DROGA (µg)	NUMERO DE RATAS (NUMERO DE INYECCIONES)	PRESION DE PERFUSION EN LA ARTERIA PULMONAR* (mmHg)		FLUJO DE LIQUIDO DESDE LA CIRCULACION PULMONAR* (cc/min)		RESISTENCIA DE LA CIRCULACION PULMONAR TOTAL* (P/Flujo)	
		CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%	CONTROL	Δ%
25	4 (4)	2.42 ± 0.55	- 11.70 ± 5.48	4.10 ± 0.094	+ 0.025 ± 1.88	0.59 ± 0.15	+ 8.50 ± 8.37
50	4 (4)	1.80 ± 0.40	- 27.1 ± 6.65	4.31 ± 0.153	+ 2.32 ± 1.37	0.42 ± 0.10	- 25.95 ± 7.255
75	3 (3)	1.88 ± 0.45	- 27.5 ± 11.54	5.70 ± 0.38	+ 5.70 ± 0.37	0.42 ± 0.10	- 36.73 ± 13.15
100	4 (4)	2.65 ± 0.28	+ 9.92 ± 3.75	4.50 ± 0.31	+ 1.52 ± 3.15	0.58 ± 0.04	+ 11.5 ± 3.28

* Los resultados se presentan como promedio y ± error standard déla media.

La administración del extracto de Poli podium leucotomos incrementó la resistencia de la circulación pulmonar total, pero se presentó taquifiaxis.

ADMINISTRACIÓN DE *Polypodium leucotomos* DURANTE 20 DÍAS. ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS

Los hallazgos anatomopatológicos consistieron en congestión, edema y hemorragia pulmonar, ya sea en forma simple o combinada, predominando la de congestión * edema.

Comparando la proporción de aparición de patología pulmonar entre las ratas controles y tratadas se observó una mayor cantidad de casos patológicos en el grupo tratado con Cf4. No se observaron diferencias significativas del peso pulmonar o corporal entre los animales controles y los tratados con Cf4. El número de casos estudiados en total fue de 60 ratas (ver cuadro 10).

CUADRO 10 HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS DE RATAS WISTAR

TRATADAS CON Cf.,

DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS O SOLUCIÓN SALINA POR VIA ORAL O SUBCUTÁNEA, DURANTE 20 DÍAS

PROCEDIMIENTO	TIPO DE PATOLOGIA PULMONAR ENCONTRADA							
	EDEMA - HEMORRAGIA	CONGESTION - EDEMA	CONGESTION - HEMORRAGICA	EDEMA - HEMORRAGIA	CONGESTION	EDEMA	HEMORRAGIA	OTROS
RATAS HEMBRAS								
Solución salina, Oral	—	—	—	—	—	—	—	—
Cf ₄ , 500 mg/kg, Oral	2	2	2	0	1	0	—	—
Solución salina, S.C.	0	0	0	0	0	0	0	0
Cf ₄ , 500 mg/kg, S.C.	0	2	2	0	0	0	0	0
RATAS MACHOS								
Solución salina, Oral	0	0	0	0	0	0	0	0
Cf ₄ , 500 mg/kg, Oral	0	1	0	0	0	1	1	0
Solución salina, S.C.	0	0	0	0	1	0	0	1
Cf ₄ , 500 mg/kg, S.C.	1	1	0	1	1	1	0	0

No se detectó ninguna diferencia significativa en la relación porcentual entre peso corporal y pulmonar de las ratas controles y tratadas. (Ver cuadro 11, 12 y 13).

ADMINISTRACIÓN DE *Poli podium leucotomos*
DURANTE 24SEMANAS
ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

Ratas hembras. (24 ratas en total)

Las ratas controles o tratadas con la fracción Cf4 de *Poli podium leucotomos* durante 24 semanas presentaron atelectasia pulmonar más frecuente entre las tratadas, bronconeumonías, hemorragias intraalveolares e hiperplasia de tejido peribronquial más frecuente entre los controles. Sólo los tratados con Cf4 presentaron bronquitis aguda, bronquitis

aguda mas bronquiectasia y una combinación de congestión, hemorragia, atelectasia y bronquiectasia. El número total de casos patológicos entre los grupos controles fue de 7 y entre los tratados con Cf4 de 10. (Ver cuadro 14).

Ratas machos. (24 ratas en total)

Se observaron 4 casos patológicos en el grupo de ratas tratadas con Cf4 extraído de *Poli podium leucotomos* y 1 en el grupo control (hemorragias intraalveolares). Las ratas tratadas presentaron atelectasias pulmonares (2), bronconeumonía, hemorragias intraalveolares * inflamación crónica (1 caso de cada una de estas tres patologías) Para mayores detalles ver el cuadro 15 y listado asociado. Sólo en el grupo VIII que recibió Cf4 se observó un aumento de peso pulmonar estadísticamente significativo. (Ver cuadros 16 y 17).

CUADRO 11

RELACIÓN PORCENTUAL ENTRE PESO CORPORAL Y PULMONAR DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON Cf₄ DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS ESTIMADO EN AMBOS SEXOS Y Diferentes VÍAS DE ADMINISTRACIÓN (ORAL Y SUBCUTÁNEA)

GRUPO	PROCEDIMIENTO (Dosis/kg)	SEXO	PESO PULMONAR / PESO CORPORAL (Gramos)*
I	Solución Salina oral (0.01 cc/kg)	F	0.99 ± 0.16
II	Cf ₄ vía oral, (500 mg/kg)	F	0.87 ± 0.08
III	Solución Salina Subcutánea (0.01 cc/kg)	F	1.1 ± 0.19
IV	Cf ₄ vía subcutánea (500 mg/kg)	M	1.1 ± 0.13
V	Solución Salina oral, (0.01 cc/kg)	M	0.72 ± 0.10
VI	Cf ₄ vía oral, (500 mg/kg)	M	0.92 ± 0.07
VII	Solución Salina Subcutánea (0.01 cc/kg)	M	0.55 ± 0.05
VIII	Cf ₄ vía Subcutánea (500 mg/kg)	M	0.73 ± 0.08

* Datos presentados como X: promedio y E.S.: ± Error standard. El t de student no reveló ninguna diferencia significativa.

CUADRO 12

RESUMEN DE LOS PESOS VISCERALES DE LAS RATAS WISTAR, CONTROLES (SALINO) Y TRATADOS CON Cf_4 OE POLYPODIUM LEUCOTOMOS (500 mg/kg), POR VIA ORAL Y SUBCUTÁNEA, DURANTE 21 DÍAS, RATAS HEMBRAS

GRUPO PROCEDIMIENTO (DOSIS / kg)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO					
	PESO VISCERAL (gramos)					
	HIGADO	PULMONES	RIÑONES	CORAZON	BAZO	SUPRARRENALES
ADMINISTRACION ORAL						
I Control (0.01 cc/kg)	7.96 ± 0.60	2.1 ± 0.35	1.43 ± 0.08	0.73 ± 0.05	0.45 ± 0.01	0.041 ± 0.002
II Cf_4 (500 mg/kg)	5.72* ± 0.16	1.64 ± 0.12	1.42 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.054* ± 0.001
ADMINISTRACION SUBCUTANEA						
III Control (0.01 cc/kg)	5.56 ± 0.31	2.2 ± 0.36	1.36 ± 0.09	0.71 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.037 ± 0.007
IV Cf_4 (500 mg/kg)	5.20 ± 0.10	1.83 ± 0.24	1.30 ± 0.08	0.65 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.047 ± 0.002

* Diferencias estadísticamente significativas entre grupo I y II. (t - Student; p <0.05)

CUADRO 13

RESUMEN DE LOS PESOS VISCERALES DE LAS RATAS WISTAR, CONTROLES (SALINO) Y TRATADOS CON Cf_4 DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS; 500 mg/kg POR VÍA ORAL Y SUBCUTÁNEA, DURANTE 21 DÍAS, RATAS MACHOS

GRUPO PROCEDIMIENTO (DOSIS / KG)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO						
	PESO VISCERAL (gramos)						
	HIGADO	PULMONES	RIÑONES	CORAZON	BAZO	SUPRARRENALES	TESTICULOS
ADMINISTRACION ORAL							
V Control (0.01 cc/kg)	7.56 ± 0.53	2.04 ± 0.33	1.89 ± 0.17	1.03 ± 0.07	0.462 ± 0.01	0.036 ± 0.0	2.19 ± 0.120
VI Cf_4 (500 mg/kg)	6.40* ± 0.20	1.89 ± 0.15	1.77 ± 0.11	0.819* ± 0.05	0.371* ± 0.01	0.040 ± 0.00	2.332 ± 0.02
ADMINISTRACION SUBCUTANEA							
VII Control (0.01 cc/kg)	8.19 ± 0.56	1.58 ± 0.15	1.97 ± 0.05	0.928 ± 0.04	0.467 ± 0.03	0.050 ± 0.006	2.498 ± 0.08
VIII Cf_4 (500 mg/kg)	8.71 ± 0.45	1.79 ± 0.13	1.88 ± 0.08	0.883 ± 0.09	0.545 ± 0.02	0.037 ± 0.00	2.479 ± 0.05

CUADRO 14

HISTOPATOLOGIA PULMONAR EN RATAS WISTAR CONTROLES (ALMIDÓN * AGUA) O TRATADAS CON Cf, OE
POLYPODIUM LEUCOTOMOS POR VIA ORAL DURANTE 24 SEMANAS, RATAS HEMBRAS

PROCEDIMIENTO (cc ó mg/kg)	PATOLOGIA PULMONAR ENCONTRADA								TOTAL DE CASOS PATOLÓGICOS
	BRONCO-NEUMONIA	HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	ATELECTASIA	BRONQUIECTASIA - HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	HIPERPLASIA DE TEJIDO PERIBRONQUIAL	BRONQUITIS AGUDA	CONGESTION HEMORRAGIA ATELECTASIA BRONQUIECTASIA	BRONQUIECTASIA - BRONQUITIS AGUDA	
CONTROLES									
0.15 cc/kg	1	1	0	1	0	0	0	0	3
0.30 cc/kg	1	1	1	0	1	0	0	0	4
SUB-TOTAL	2	2	1	1	1	0	0	0	7
Cf _o									
250 mg/kg	1	0	2	0	0	1	1	0	5
500 mg/kg	0	1	3	0	0	0	0	1	5
SUB-TOTAL	1	1	5	0	0	1	1	1	10
TOTAL DE CASOS	3	3	6	1	1	1	1	1	17

CUADRO 15

HISTOPATOLOGIA PULMONAR EN RATAS WISTAR CONTROLES (ALMIDÓN * AGUA) O TRATADAS CON Cf DE
POLYPODIUM LEUCOTOMOS POR VÍA ORAL DURANTE 24 SEMANAS. RATAS MACHOS

PROCEDIMIENTO	PATOLOGIA PULMONAR ENCONTRADA				TOTAL DE CASOS PATOLÓGICOS
	HEMORRAGIAS INTRAALVEOLARES	HEMORRAGIAS INTRA-ALVEOLARES - INFLAMACION CRÓNICA	ATELECTASIAS PULMONARES	BRONCONEUMONIAS	
CONTROLES					*
0.15 cc/kg	0	0	0	0	0
0.30 cc/kg	1	0	0	0	1
SUB-TOTAL	1	0	0	0	1
Cf _o					
250 mg/kg	0	1	1	0	2
500 mg/kg	0	0	1	1	2
SUB-TOTAL	1	1	2	1	4
TOTAL DE CASOS	1	1	2	1	5

CUADRO 16

RESUMEN DE LOS PESOS VISCERALES DE LAS RATAS WISTAR CONTROLES TRATADOS DURANTE 24SEMANAS. RATASHEMBRAS

GRUPO PROCEDIMIENTO (Dosis/kg)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO PESO VISCERAL (gramos)						
	HIGADO	CORAZON	PULMONES	ESTOMAGO	BAZO	RIÑONES	SUPRARRENALES
I Control H ₂ O + Almidón (0.15 cc/kg)	8.650 ± 0.381	1.150 ± 0.033	2.833 ± 0.210	1.533 ± 0.075	0.683 ± 0.030	2.00 ± 0.057	0.0518 ± 0.0061
II Cl ₄ 250 mg/kg	9.616 ± 0.474	1.016* ± 0.220	2.783 ± 0.047	1.58 ± 0.065	0.628 ± 0.019	1.883 ± 0.085	0.0591 ± 0.0028
III Control H ₂ O + Almidón (0.3 cc/kg)	8.283 ± 0.250	1.333 ± 0.108	2.766 ± 0.256	1.683 ± 0.107	0.633 ± 0.108	1.95 ± 0.145	0.078 ± 0.010
IV Cl ₄ (500 mg/kg)	9.366 ± 0.326	1.033 ± 0.156	1.766* ± 0.133	1.683 ± 0.144	0.533 ± 0.108	1.70 ± 0.163	0.074 ± 0.0048

Diferencia estadísticamente significativa entre grupos correspondientes (P < 0.05) usando t de Student. La vía de administración usada fue la oral.

CUADRO 17

RESUMEN DE LOS PESOS VISCERALES DE LAS RATAS WISTAR CONTROLES Y TRATADOS DURANTE 24SEMANAS. RATAS MACHOS

GRUPO PROCEDIMIENTO (Dosis/kg)	PROMEDIO Y ± ERROR STANDARD DEL PROMEDIO PESO VISCERAL (gramos)						
	HIGADO	CORAZON	PULMONES	ESTOMAGO	BAZO	RIÑONES	SUPRARRENALES
V Control H ₂ O + Almidón (0.15 cc/kg)	17.180 ± 0.964	1.685 ± 0.069	2.63 ± 0.156	± 2.033 ± 0.144	0.650 ± 0.066	3.00 ± 0.143	0.0606 ± 0.0027
VI Cl ₄ (250 mg/kg)	14.460 ± 0.658	1.733 ± 0.235	2.56 ± 0.330	2.516* ± 0.186	0.900* ± 0.096	3.233 ± 0.147	0.0495* ± 0.0047
VII Control H ₂ O + Almidón (0.3 cc/kg)	15.25 ± 0.412	1.433 ± 0.155	3.56 ± 0.061	2.216 ± 0.070	0.933 ± 0.042	3.033 ± 0.135	0.04616 ± 0.0017
VIII Cl ₄ (500 mg/kg)	15.74 ± 0.645	1.380 ± 0.096	3.10* ± 0.187	2.060 ± 0.060	0.820 ± 0.096	2.960 ± 0.121	0.04260 ± 0.0025

* Diferencia estadísticamente significativa entre grupos correspondientes (P < 0.05) usando t de Student. La vía de administración para las ratas controles y tratadas fue la oral.

ESTUDIOS Histopatológicos DE RATAS WISTAR QUE RECIBIERON Cf₄
EXTRAÍDO DE *Poli podium leucotomos* POR 24 SEMANAS

R E S U L T A D O S

PULMONES	RATAS CONTROLES
Rata No. 8	Presentó bronconeumonía
Rata No. 9	Presentó hemorragias intraalveolares de pulmón
Rata No. 10	Presentó bronquiectasia pulmonar. Hemorragias pulmonares intraalveolares.
Rata No. 19	Presentó atelectasias pulmonares
Rata No. 20	Presentó hemorragia intraalveolar pulmonar
Rata No. 21	Presentó hiperplasia de tejido peribronquial
Rata No. 22	Presentó bronconeumonía de pulmón derecho
PULMONES	RATAS TRATADAS CON Cf ₄
Rata No. 1	Bronquitis aguda
Rata No. 3	Bronconeumonía bilateral
Rata No. 4	Congestión y hemorragia intraalveolares atelectasia y bronquiectasia
Rata No. 5	Atelectasias pulmonares
Rata No. 6	Atelectasias pulmonares
Rata No. 13	Bronquiectasia con bronquitis aguda
Rata No. 14	Hemorragias intraalveolares focales de pulmón
Rata No. 16	Atelectasias pulmonares
Rata No. 17	Atelectasias pulmonares focales
Rata No. 18	Atelectasias pulmonares

EXPERIMENTOS EN RATAS HEMBRAS

D I S C U S I Ó N

Las fracciones hidro y liposolubles (Cf₄ y Cf₃) obtenidas de los rizomas y de las hojas del helecho *Poli podium leucotomos* se han usado con resultados favorables en el tratamiento de la psoriasis, osteoartritis y dermatitis atópica. La exploración fotoquímica de los extractos ha revelado que contiene gran cantidad de sustancias: carbohidratos, flavonoides, viscianinas, triterpenos, minerales y otras. Todavía no se puede identificar entre todas ellas al grupo químico responsable de sus efectos beneficiosos. Al extracto se le han encontrado efectos antianabólicos *in Vitro* en tumores canceroso, sospechándose que sus acciones son ejercidas a nivel de la membrana, afectando poco enzimas claves del metabolismo de los carbohidratos. (10) Las fracciones Cf₄ + Cf₃ aumentan el número y la longevidad de los fibroblastos de rata cultivados *in Vitro*, favorecen la producción de colágeno y posiblemente la cicatrización de heridas. En humanos Anapsos (Cf₄ + Cf₃) aumentó transitoria-

mente los linfocitos T supresores y por ello podríamos suponer que induce una disminución de la génesis de auto anticuerpos. Con estos antecedentes resultó necesario conocer si los extractos de *Poly podium leucotomos* tienen efectos directos sobre volúmenes y mecánica respiratoria en diferentes especies de animales, comprendiendo el presente trabajo otro aspecto muy importante, cual es la toxicología pulmonar subaguda y crónica practicada en ratas, cuyos resultados en lo atingente a pulmón se discuten aquí.

La administración de las fracciones hidro y liposolubles obtenidas de los rizomas u hojas de *Polypodium leucotomos* por vía I.G. ó I.V. en ratas produjo una fase inicial de bradipnea o de apnea acompañada de taquipnea con aumento de la profundidad de los movimientos respiratorios y luego un período de normalización. La fase inicial de bradipnea coincide con la hipotensión arterial descrita en otros trabajos. (11)

Las fracciones de *Poli podium leucotomos* no modificaron la respuesta respiratoria producida por inyecciones I.V. de acetilcolina o adrenalina. Cf₄ incrementó ligeramente la taquipnea producida por la serotonina y redujo la hipotensión y traquipnea inducida por la inyección I.V. de prostaglandina E₁. Es de hacer notar que en la piel del paciente psoriático se ha descrito un aumento del ácido araquidónico, PG E₂ y PG F₂ alfa y otras sustancias relacionadas.

La fracción Cf₄ incrementó la frecuencia respiratoria basal observada tras las inyecciones repetitivas de histamina, también aumentó significativamente las respuestas hipotensoras que antes de la inyección del extracto apenas ejercían efecto alguno sobre presión arterial. En la piel del paciente psoriático algunos estudios han revelado un aumento de la cantidad de matositos con granulaciones alteradas.

En perros la administración de la fracción hidrosoluble Cf₄ no modificó las respuestas respiratorias a la inyección de acetilcolina, adrenalina, estimulación vagal u oclusión carótida. En este último caso la respuesta hipertensora sí fue bloqueada. (11)

En perros la tendencia de los cambios observados después de inyectar el extracto de Cf₄ por vía I.V. fue una reducción de la resistencia aérea y de la presión transpulmonar con leves cambios positivos

en flujo, volumen y frecuencia respiratoria por minuto. La fase de taquipnea fue suprimida cuando se practicó una vagotomía bilateral a nivel del cuello, por lo que podría deberse a estímulo de carácter reflejo.

En conejos preparados para medir los volúmenes pulmonares y mecánica respiratoria, la inyección de Cf4 y I.G. después de histaminal.V. no contrarrestó el efecto de este bronco constrictor, más bien incrementó la resistencia pulmonar en casi todo el rango de dosis de *Poli podium leucotomos* empleadas: 50, 200 y 400 mg/kg I.G. En ratas este extracto incrementó los efectos hipotensores de la histamina, pero fácilmente apareció taquifilaxis. Aunque no se ha probado la combinación de antihistamínicos H2 h H1, estos últimos (*difenhidramina*)

histamínicos H2 + H1, estos últimos (*difenhidramina*) no bloquearon los efectos hipotensores de Cf4 en ratas. Durante el empleo clínico de las fracciones Cf4 + Cf3 de *Poli podium leucotomos* se ha observado una reactivación del cuadro psoriático durante las fases iniciales de su tratamiento y que les ha inducido a usar antihistamínicos. (3) La fracción Cf4 de *Poli podium leucotomos* en los conejos toracotomizados aumentó la presión de la arteria pulmonar, la presión auricular izquierda, la presión directriz y la contractibilidad cardíaca; la frecuencia cardíaca casi no se modificó. (*In vivo*). En los pulmones aislados y perfundidos de rata la inyección de la fracción Cf4 incrementó la resistencia de la circulación pulmonar total y la presión de perfusión en la arteria pulmonar, con cambios mínimos en el flujo procedente de la circulación pulmonar. Es de hacer notar que la histamina produce bronco-constricción y vasoconstricción pulmonar. La dirección de los cambios producidos por la inyección de Cf4 es parecida a aquella en el conejo (bronco constricción h hipertensión pulmonar), pero en el perro se produce bronco dilatación leve.

Cuando se administraron ininterrumpidamente dosis elevadas de Cf4 por vía oral durante 20 días (estudios toxicológicos subagudos) se observaron algunos cambios histopatológicos a nivel pulmonar: congestión h edema, congestión h hemorragia, edema h hemorragia y congestión, edema o hemorragia en forma individual. El número total de casos estudiados fue de 60 ratas, 10 resultaron con patología en los grupos tratados. Además, no se detectó ninguna diferencia significativa en la relación porcentual entre peso corporal y pulmones de las ratas controles y tratadas.

En el caso de tratamiento durante períodos más prolongados —seis meses— con Cf4 por vía oral o sea toxicología crónica, de un total de 48 ratas se observó atelectasia pulmonar (5 casos) y un caso de cada una de las siguientes categorías: bronconeumonía, bronquitis aguda, bronquiectasia más bronquitis aguda, congestión h hemorragia h atelectasia h bronquiectasia y finalmente hemorragia intraalveolar. En los grupos controles además se observó un caso de hiperplasia de tejido peribronquial y otro de una combinación de bronquiectasia mas hemorragia intraalveolar. En forma global no existió diferencia significativa entre el número de casos patológicos del grupo control con él tratado. A las 16 semanas de tratamiento se hizo una evaluación cardiovascular y de respiración, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados y controles. Es de hacer notar que algunas veces la falta de uso de ratas libres de gérmenes (obtenidas por cesárea), la falta de llenado de los pulmones a presión positiva durante la fijación con formalina (toxicología crónica), el corte de cuello con tijeras en los animales estudiados para toxicología subaguda, preliminarmente pueden inducir y explicar alguna patología de la observada; sin embargo, es necesario tratar de detectar problemas pulmonares en los pacientes tratados con calaguala, por todo lo aquí expuesto. Es necesario estudiar el efecto de *Poly-podium leucotomos* en los problemas inmunológicos del pulmón.

BIBLIOGRAFIA

1. Portillo Núñez, PR.; Mendoza M., M.V.: "Extracto purificado de calaguala en el tratamiento de la soriasis en comparación con placebo, en un ensayo clínico controlado a doble ciego". Rev. Médica Hondureña. Vol. 53. Pág. 8 a 17. 1985.
2. Mendoza, M.V.; Castro Sierra, H.: "Producto Seco 791 en osteoartritis. Evaluación abierta de su actividad terapéutica en 84 casos". Rev. Médica Hondureña. Vol. 50, No. 2. Pág. 55-61. 1983.
3. Beltrán, R.; Mateo, M.; Ascensión P.: "Comunicación sobre un nuevo tratamiento efectuado con 130 niños afectados de dermatitis atópica" Internat. Congress of Allergology and Clinical Immunol". Londres, Oct. 1982.
4. Horvath A et al: "Metabolic effects of calagualine an antitumoral saponine from *Polypodium leucotomos*. Nature, Vol. 214 No. 5094 pp 1256-1258. 1977.

- Horvath A.; Tabora E. Alterations of collagen in psoriatic skin. *Dermatológica*. 144: 83-91. 1972.
6. Tabora E. Efecto de la fracción Cf₄ de Polypodium leucotomos sobre el metabolismo del colágeno de la rata albina. Tesis de Graduación. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. 1970.
7. Ponce E.; Ponce C; Cambar P.: "Efecto de la fracción Cf₄ del extracto de Polypodium leucotomos sobre fibroblastos de embrión de rata cultivados In Vitro *Rev. Méd. Hondureña*. Vol. 52. pp 148-150. 1984.
- Vargas, J.; Muñoz C.; Osorio C; Garcia Olivares, E.: "Anapsos, an ant psoriatic drug which increases the proportion of suppressor cells in human peripheral blood. *Ann Immunol. (Inst. Pasteur)* 134 C, 393-400. 1983.
9. Amdur, M.D.; Mead, J.: "Mechanics of respiration in unanaesthetized guinea pig" *Am. J. Physiol.* 192 (2): 364-8,1958.
10. Seaman, I. I.: "Estudio metabólico In vitro del Polypodium leucotomos (calaguala) en Hígado de Rata. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1971.
11. Cambar P. J.; Mendoza, MM.; Portillo, P.; Seaman I.; Bulnes, R.: "Efectos cardiovasculares producidos por las fracciones hidro y liposolubles obtenidas de Polypodium leucotomos en animales de experimentación". *Serie de comunicaciones progresivas*. Julio de 1985.

NOTA FINAL

La transcripción, mimeografiado, compaginación y encuadernación del presente trabajo estuvo a cargo de Juan Ramón Barahona, a quien agradezco la excelente realización del mismo.

PABLO J. CAMBAR DIRECTOR DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA