

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA
DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO
POR EXTRACTOS DE CINCO PLANTAS MEDICINALES
USADAS EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES PROTOZOARIAS
INTRACELULARES

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

ANNABELLA OSORIO V.

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, julio de 2003

UNIVERSIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

DL
06
T(2124)

JUNTA DIRECTIVA

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Carlos Enrique Serrano	Vocal IV
Br. Claudia Lucía Roca Berreondo	Vocal V

DEDICO ESTA TESIS

A JESÚS	Dios y hombre, ejemplo de fortaleza, bondad, tolerancia y de amor
A MIS PADRES	Por invertir en mi cada uno de sus esfuerzos diarios, brindándome la oportunidad de realizar mi vida.
A MIS HERMANOS	Por su compañía en mis tristezas y alegrías.
A MI HIJO	José Eduardo, Regalo de Dios.
A MI ESPOSO	Ser que le dio más luz a mi vida.
A MIS AMIGOS	Por compartir conmigo parte de su vida
A MIS ASESORES	Por su guía y ejemplo
A MIS PADRINOS	Por ser fuente de ánimo y de fortaleza.
A MIS MAESTROS	Por el infinito empeño que ponen para formar seres de bien.

DEDICO ESTE ACTO

A GUATEMALA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

A LA ESCUELA DE QUÍMICA BIOLÓGICA

AL DEPARTAMENTO DE CITOHISTOLOGÍA

A FARMAYA

A TODOS LOS QUE HICIERON POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTE SUEÑO

A USTED

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por darme la oportunidad de realizar parte de mis sueños.

A mis asesores Licda. Ana Margarita Paz de Ramírez y Lic. Armando Cáceres por su amistad, paciencia, confianza y dedicación

A mis revisores Licda. Amanda Gálvez y Lic. Martín Gil, por dar los toques de perfección en este trabajo.

Al departamento de Citohistología, especialmente a Licda. María Eugenia Paredes y Licda. María Paula de León por su paciencia y dedicación.

Al Laboratorio Clínico Santa Elisa, por su apoyo incondicional.

Al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya y al banco de Sangre del IGSS zona 9 especialmente a Licda. Marleni Mazariegos, por su apoyo.

A la Unidad de Salud especialmente a Licda. Juana Alicia Castellanos, Licda. Marta Campos Urizar, Dr. Carlos Catalán y Dr. Danilo Olivero Morales, por su amistad y el apoyo incondicional en la realización de este trabajo

A la Facultad de Veterinaria, especialmente al Dr. Denis Guerra, por su ayuda.

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia especialmente a la Sra. Norma Tánchez (QEPD), por su amistad, por su paciencia y apoyo incondicional.

ÍNDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	2
III	ANTECEDENTES	4
	A. Sistema Inmune	4
	B. Respuesta Inmune	5
	a) Respuesta inmune innata	5
	b) Respuesta inmune adquirida	5
	C. Sistema Del complemento	6
	a) Nomenclatura	6
	b) Activación	7
	c) Ruta lítica	10
	d) Regulación	11
	e) Consecuencias Biológicas	12
	f) Ensayos hemolíticos para su valoración	13
	D. Inmunomodulación	14
	E. Medicina Tradicional	15
	a) Fitoterapia	15
	b) Uso de plantas medicinales	17
	c) Estudios de Plantas inmunomoduladoras	17
	d) Estudios de plantas antiparasitarias	18
IV	JUSTIFICACIÓN	24
V	OBJETIVOS	25
VI	HIPÓTESIS	26
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
VIII.	RESULTADOS	37
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
X.	CONCLUSIONES	48
XI.	RECOMENDACIONES	49
XII.	REFERENCIAS	50
XIII.	ANEXOS	58

I. RESUMEN

Para este trabajo se utilizaron extractos etanólicos de cinco plantas que tienen actividad contra protozoos intracelulares. Los extractos son hojas de *Lippia graveolens* (Orégano, Mejorana), hojas de *Neurolaena lobata* (Tres puntas, Mano de Lagarto, Tabaquillo), hojas y raíz de *Petiveria alliacea* (Apacín), corteza de *Rhizophora mangle* (mangle) hojas de *Solanum americanum* (Hierba Mora, Macuy, Quilete); se les realizó un tamizaje para demostrar actividad inmunomoduladora *in vitro* sobre la vía clásica, la vía alterna y la ruta lítica del sistema del complemento aplicando técnicas de ensayos hemolíticos.

Los extractos que demostraron actividad inhibidora de la vía clásica del sistema de complemento son hojas de *P. alliacea* ($CI_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$), raíz *P. alliacea* ($CI_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$) y hojas *S. americanum* ($CI_{50} = 8 \mu\text{g/ml}$).

Los extractos que demostraron actividad estimulante de la vía alterna del sistema de complemento son hojas de *P. alliacea* ($CI_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$), raíz *P. alliacea* ($CI_{50} = 6 \mu\text{g/ml}$) y hojas *S. americanum* ($CI_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$).

En la ruta terminal ninguno de los extractos estudiados presentó actividad inmunomoduladora.

Con lo mencionado anteriormente se demuestra que algunas las plantas estudiadas poseen actividad inmunomoduladora sobre la vía clásica y la vía alterna del sistema del complemento.

II. INTRODUCCIÓN

En todos los ambientes en los que vive el ser humano está en contacto con una gran variedad de microorganismos y muchos de ellos son causantes de enfermedades. Sin embargo, éstos no son la única causa de enfermedad, ya que también pueden ser producidas por respuestas aberrantes del sistema inmune, lo que ha provocado que se investigue una gran serie de agentes terapéuticos para contrarrestar las respuestas erradas del sistema inmune o a microorganismos patógenos (1).

A lo largo de la historia se han usado diversos productos terapéuticos; en un inicio fueron las plantas, las cuales fueron discriminadas por algún tiempo debido al auge de la química sintética y la biología molecular que prometieron suplir de nuevos productos con muy buenos resultados. Pero en la práctica al aplicar estos productos como medicina convencional muchos de ellos no han cumplido con los objetivos esperados, lo que ha obligado al hombre a buscar otras alternativas. Esto lo hizo encontrarse de nuevo con las plantas como fuente de agentes terapéuticos (2).

El uso de plantas no solamente se basa en los conocimientos de la medicina tradicional. Actualmente surge la necesidad de conocer las propiedades, los mecanismos de acción y los beneficios que ofrece el uso de plantas medicinales y aromáticas, por lo que se realizan investigaciones sistemáticas experimentales y clínicas (3).

Las plantas son un importante hallazgo para el cuidado de la salud en el mundo entero. Guatemala no es la excepción y por su ubicación geográfica es una fuente rica de una gran diversidad de plantas. El uso de estas plantas con propósito medicinal es una de las pocas costumbres que ha logrado sobrevivir al transcurso de los siglos y al destello del desarrollo. Esta costumbre se ha transmitido de generación en generación hasta nuestros días. En este país a partir de 1927 se inició la recopilación y documentación de datos sobre estas plantas. Posteriormente se estandarizaron metodologías de estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar posibles actividades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias y efectos tóxicos (4).

Actualmente existe la necesidad de conocer un posible mecanismo de acción que consiste en determinar si las plantas usadas contra protozoos intracelulares intervienen en el sistema inmunológico modificando la respuesta inmune ya sea aumentándola o disminuyéndola, es decir con actividad inmunomoduladora. La respuesta inmune es tan amplia, variada y compleja que no se puede realizar un solo modelo *in vitro* para estudiar todas las interacciones entre células y moléculas, por lo que los estudios se realizan individuales o aislados. En este caso se eligió el sistema del complemento; para iniciar esta fase de investigación se seleccionaron cinco plantas de un grupo de aproximadamente siete que habían mostrado actividad antiprotozoaria para el tratamiento de infecciones por protozoos intracelulares y se les realizó un tamizaje de actividad inmunomoduladora *in vitro* sobre la vía clásica, la vía alterna y la ruta lítica del sistema del complemento aplicando las técnicas de ensayos hemolíticos (5-7).

III. ANTECEDENTES

A. SISTEMA INMUNE

En nuestro ambiente existe una gran variedad de virus, bacterias, hongos, parásitos y otras sustancias como las toxinas; cualquiera de éstos puede causar un daño patológico. La gran mayoría de infecciones son de duración limitada y causan un pequeño daño permanente, debido a que en los vertebrados, incluyendo al hombre, existe un sistema inmune que combate los agentes patógenos (1, 8).

El término inmunidad (del latín *immunis*, libre de) se aplicó en un principio a la resistencia de los individuos ante las infecciones microbianas. Por lo tanto la inmunología se desarrolló a partir de los estudios de las enfermedades infecciosas y las respuestas del organismo hacia ellas (9, 10).

El sistema inmune es un sistema de vigilancia o reconocimiento, cuyas principales funciones consisten en aceptar o tolerar lo propio y eliminar lo "extraño" que ha ingresado dentro del hospedero ya sea un agente patógeno, injerto de tejido o una sustancia ambiental inocua (10, 11).

El funcionamiento del sistema inmune está interconectado con el sistema nervioso central y el sistema endocrino (12-16).

El cuerpo humano está dotado de bacterias que por lo general son inofensivas, la llamada microbiota normal. Un sistema inmunológico intacto establece un delicado equilibrio entre el cuerpo y las bacterias, pero existen ciertos factores como los ambientales, los psicológicos, la desnutrición, la edad, las heridas, un sistema inmunológico deteriorado, y un sistema nervioso alterado que pueden trastornar este balance, por lo que las bacterias inofensivas pueden volverse nocivas o algún agente patógeno puede entrar al organismo con mayor facilidad, donde se multiplica y causa enfermedad (14-17).

El cuerpo humano también posee una serie de barreras naturales que lo protegen de la infección de agentes patógenos: la piel, membranas mucosas, pH, temperatura, sustancias antimicrobianas (lisozimas, beta-lisina y espermina), y la protección que nos confiere la microbiota normal. Si algún agente patógeno logra atravesar las barreras naturales se pone en marcha la respuesta inmune (14, 18).

B. RESPUESTA INMUNE

Consiste en la actuación integrada de un gran número de mecanismos heterogéneos de defensa, se inicia con la presencia de un estímulo (inmunógeno) y culmina con la eliminación del agente que lo provoca. Su función primaria es discriminar entre lo "propio" y lo "extraño" y por ende eliminar lo "extraño". Se divide en respuesta inmune innata y respuesta inmune adquirida (10, 18).

a) Respuesta inmune innata (natural o inespecífica):

Actúa como la primera línea de defensa contra agentes patógenos y evita que ellos establezcan infecciones. Se le llama inmunidad innata porque no depende de la exposición previa al inmunógeno. Está presente desde el nacimiento, carece de especificidad y memoria inmunológica. Sus elementos principales son células fagocíticas que ingieren agentes patógenos que logran atravesar las superficies epiteliales o endocitan macromoléculas (1, 8, 10, 18).

b) Respuesta inmune adquirida (adaptada o específica):

Si las defensas que proporciona el sistema de inmunidad innata son incapaces de prevenir totalmente la infección funciona la respuesta inmune adquirida que produce una reacción específica para cada agente patógeno, ésta normalmente erradica dicho agente. El sistema inmune adquirido tiene memoria inmunológica específica que evita que el agente patógeno provoque enfermedad en una segunda infección. Los mecanismos se dividen en respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular (1, 10).

Los mediadores de la inmunidad adquirida humoral son los anticuerpos, que son producidos por los linfocitos B; éstos reaccionan con una parte específica del inmunógeno llamado antígeno. La unión antígeno-anticuerpo provoca la activación del complemento. La respuesta inmune adquirida celular está formada por linfocitos T: los linfocitos T colaboradores y los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos destruyen células propias del organismo infectadas por virus. Los linfocitos T colaboradores activan macrófagos linfocitos T citotóxicos y linfocitos B (18).

Los dos sistemas de respuesta inmune trabajan cronológicamente coordinados, y se considera que el sistema del complemento actúa como integrador del funcionamiento de ambas (17).

C. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

En el siglo XIX Ehrlich uso el término "complemento" para designar la actividad del suero que podía complementar la capacidad de los anticuerpos específicos de lisar bacterias, el cual fue descubierto en 1895 por Jules Bordet quien lo descubrió, lo bautizó como "alexina" y lo caracterizó frente a los anticuerpos por su termolabilidad e inespecificidad. En 1907 Ferrara comenzó a caracterizar algunos de los componentes recurriendo a métodos de diálisis (9, 19).

El complemento es un sistema funcional de aproximadamente 30 proteínas, produce una rápida y amplificada respuesta hacia determinado estímulo provocando un proceso de activación en forma de cascada en el cual los productos de una reacción catalizan al próximo producto; la mayoría de proteínas que lo conforman son enzimas que existen en el suero como precursores inactivos o proenzimas (zimógenos) que requieren su ruptura proteolítica para convertirse en enzimas activas. Está compuesto de cuatro unidades funcionales principales: la vía clásica, la vía alterna, un circuito de amplificación y la ruta terminal. La activación y fijación del complemento a microorganismos constituye un importante mecanismo efector del sistema inmune, facilitando la eliminación del antígeno y generando una respuesta inflamatoria (6, 7, 19-22).

Las proteínas del sistema del complemento forman dos cascadas enzimáticas importantes que son la vía alterna y la vía clásica. Las dos vías comparten la última fase que consiste en el ensamblaje sobre la superficie del microorganismo del denominado complejo de ataque a membrana (19-22, 23).

a) Nomenclatura:

En la vía clásica los componentes recibieron denominaciones con números tras la letra "C" conforme se descubrían, por lo que el orden de actuación de los componentes no

guarda relación con su nomenclatura. En la activación intervienen 9 componentes los cuales se numeran de C1 – C9. Los cuales se dividen en tres grupos funcionales.

- C1 o grupo de reconocimiento
- C4, C2 y C3 o grupo de activación
- C5, C6, C7, C8 y C9 o grupo de ataque a la membrana

A los componentes de la vía alterna se les llaman factores y su nomenclatura es a base de una letra mayúscula: factor B, factor D, factor H y factor P.

1. Las formas activas se le coloca una barra horizontal sobre el nombre del componente y las formas inactivas se denominan colocando una “i” delante del componente respectivo, por ejemplo la forma inactiva de C4b es iC4b.
2. Cuando un componente se rompe proteolíticamente en dos, el fragmento de mayor tamaño se designa con la letra “b”; el fragmento de menor tamaño se designa con una “a” tras el nombre del elemento original, por ejemplo la ruptura de C3 genera un fragmento grande denominado C3b y un fragmento pequeño C3a. El único componente que es la excepción a esta regla es C2, el fragmento grande se llama C2a y el fragmento pequeño es C2b (9, 19-22).

b) Activación del complemento:

1. Activación de la vía clásica:

Activación del complejo C1: la activación de la vía clásica inicia por la unión del complejo C1 a inmunocomplejos (anticuerpos unidos a antígenos). El C1 es un complejo formado por 5 proteínas y estabilizado por iones Ca^{2+} , consta de 1 molécula de C1q, dos de C1r y dos de C1s (1, 19, 22, 23).

C1q: está formado por tres copias de una unidad fundamental, que tiene forma de “Y”, está a su vez constituida por dos grupos de tres cadenas formando cada una entre sí una triple hélice. El C1q tiene dos regiones un fragmento afin al colágeno y una pieza globular. El extremo Carboxi-terminal tiene configuración globular, y es el sitio de unión de la porción Fc de las inmunoglobulinas IgM, IgG3, IgG1 o IgG2, siempre que éstas ya

estén formando parte de inmunocomplejos. Los activadores del C1q han sido divididos en inmunes y no inmunes dependiendo de la naturaleza del activador, un activador inmune incluye agregados de IgG e IgM los cuales se enlazan al C1q en la región globular (9, 19, 24). Los ejemplos de activadores no inmunes son heparina (anticoagulante polianiónico), protamina (un polication que es usado para bloquear la heparina), ADN, Proteína C Reactiva, el lípido A de la endotoxina de las bacterias gram-negativo, algunos polisacáridos (dextrán), los condroitinsulfatos y péptido β -amiloide, los cuales se enlazan a la región afín al colágeno (9, 19, 22).

Las dos unidades de C1r y las dos de C1s se disponen descansando sobre los brazos de C1q. Los dominos catalíticos de C1r se sitúan hacia el centro. La unión de varios dominios globulares de un mismo complejo al C1 induce un cambio conformacional, que activa una molécula de C1r por autocatálisis; a su vez esta C1r activada activa a la otra molécula de C1r las dos moléculas activadas de C1r ejercen la hidrólisis de las dos C1s, las dos C1s activadas poseen actividad de serin-esterasas (19, 22).

2. Producción de la C-3 convertasa de la ruta clásica:

El siguiente paso es la ruptura catalítica de C4 por el C1s que está dentro del complejo activo C1qr2s2, liberándose el fragmento pequeño C4a y el fragmento C4b*. Este C4b* es un intermediario inestable que enseguida es atacado nucleofilicamente; la mayoría de las moléculas se hidrolizan para dar la forma inactiva iC4b, mientras que algunas de éstas forman enlaces covalentes con grupos amino o hidroxilo de las moléculas que se encuentran en la superficie de la membrana de un microorganismo, si es que ésta existe (9, 19, 20, 22).

El C4b unido a la superficie microbiana va a servir ahora como sitio de unión del componente C2, se forma el complejo C4bC2 en la membrana del patógeno, cerca de donde quedó fijo el complejo C1; esta reacción sólo tiene lugar en presencia de iones Mg^{+2} (9, 19, 20).

El C2 del complejo C4b2 es a su vez otro sustrato del C1s, cuya acción genera el fragmento pequeño C2b que queda en solución y el grande C2a queda en la membrana del microorganismo, el C4b2a forma la enzima C-3 convertasa de la vía clásica (9, 19, 22).

3. Acción de la C-3 convertasa de la vía clásica:

El C3 intacto posee un enlace tioéster interno entre una cisteína y una glutamina que es muy estable (19). La C-3 convertasa cataliza la ruptura del C3 cerca del extremo amino-terminal de la cadena α generando C3a y el componente inestable C3b*. En el C3b* el enlace tioéster se vuelve muy inestable; el azufre queda con carga neta negativa (-S), mientras que el carbono queda como grupo carbonilo ($-C^+=O$). De esta forma, este enlace se vuelve muy susceptible a ataque nucleofílico (9, 19). Un grupo nucleofílico cercano perteneciente a una proteína o azúcar de la superficie del microorganismo reacciona ahora con el grupo carbonilo del C3b*, lo que produce la unión covalente ($--CO-O-$) entre el C3b y la superficie microbiana. Este C3b unido a la membrana actúa a su vez como núcleo "focalizador" (propiedades de inmunoadherencia y opsonización) para continuar la activación del complemento fijándose grandes cantidades de C3b a la superficie del microorganismo (19, 25).

4. Activación de la vía alterna:

Esta se activa directamente sobre la superficie de muchos microorganismos, células extrañas u otras sustancias que se introducen en el cuerpo. Opera varios días antes de que entre en acción la vía clásica (19).

Se puede activar por sustancias inmunológicas (agregados de inmunoglobulinas IgA, IgM, IgE e IgG) y por sustancias no inmunológicas (polisacáridos, endotoxinas de bacterias gram negativas, paredes de levaduras, zymosan, factor de veneno de cobra, eritrocitos de conejo, virus etc.) (9, 20, 22).

5. Activación "al relenti" o "marcapasos"

En ausencia de infección se está produciendo continuamente una activación limitada de cantidades pequeñas de C3b* (19, 22).

El enlace tioéster interno del C3 se hidroliza espontáneamente en agua, dando una forma llamada C3i. Este C3i actúa como sitio de unión para el factor B, generando el complejo C3iB, sobre este complejo actúa el factor D, que rompe el B unido para generar Ba y el complejo C3iBb, que actúa como una C-3 convertasa en fase fluida. Y éste es el que rompe proteolíticamente el C3 en C3a y C3b* (19).

Este C3b* está en fase fluida, la mayor parte de él se hidroliza por agua y se inactiva, pero si por casualidad se topa con una superficie no propia se une covalentemente a ella e inicia un circuito de amplificación de la vía alterna que va a conducir a que muchas moléculas de C3b se anclen (19, 22).

6. Circuito de amplificación positiva:

El C3b recién unido a la membrana microbiana sirve para que espontáneamente se una a él el factor B. El resultante complejo C3bB es a su vez sustrato del factor D, que es otra serín-proteasa, la cual en presencia de iones Mg^{+2} rompe el B unido, generando el complejo activo C3bBb (9, 19-21).

El complejo C3bBb es una C-3 convertasa (cuya actividad reside en Bb), pero se disocia rápidamente si no se estabiliza por unión con la properdina (factor P), que forma el complejo estable C3bBbP, que es la C-3 convertasa de la vía alterna (19).

c) Ruta lítica y el complejo de ataque a la membrana

La fase final de la activación y fijación del complemento consiste, en la formación de una C-5 convertasa, que rompe enzimáticamente el C5 desencadenando el ensamblaje sobre la superficie de un cuerpo extraño el complejo de ataque a membrana (MAC) (1, 9, 19, 20).

La C5-convertasa de la vía clásica se forma por unión covalente de una unidad de C3b al complejo C4b2a, para generar C4b2a3b (9, 19).

En la vía alterna la C5-convertasa se forma por unión covalente de un C3b al complejo C3bBb que forma parte de la C3b-convertasa: C3bBb3b (19).

La C-5 convertasa cataliza la ruptura de unidades de C5 en C5a (que queda libre) y C5b que se une a la membrana microbiana. A partir del C5b, todas las rutas del complemento confluyen (las fases son las mismas) (1, 9, 19).

Una vez unido el C5b a la membrana del microorganismo, se van añadiendo ordenada y secuencialmente una serie de componentes del complemento de forma no enzimática: al C5b se une a una molécula de C6, luego una de C7; es ahora cuando el complejo resultante (C5b67) experimenta una transición hidrófoba que hace que el C7 se "hunda" en la membrana microbiana. Realizada esta transición, se puede unir el C8, y finalmente, 14 unidades del componente C9. Estos monómeros de C9 se ensamblan entre sí para dar una notable estructura (poli-9) en forma de canal ó hueco que atraviesa la membrana de lado a lado, con unos 10 nm. de diámetro interno (1, 9, 19).

El conjunto C5b678poli-9 es lo que constituye el denominado complejo de ataque a membrana (MAC, según sus iniciales en ingles), cuyo efecto esencial es producir un notable desequilibrio osmótico en el microorganismo (se permite el paso de agua y sales del medio extracelular hasta el medio intracelular de modo que la célula se hincha y finalmente estalla, a este proceso se le llama citólisis ó lisis celular) en las bacterias gram-negativo se inserta en la membrana externa, favoreciendo la entrada de lisozimas, y en las gram-positivo se inserta en la membrana citoplásmica, destruyendo los gradientes electroquímicos (9, 19, 21).

d) Regulación del complemento

Hay varios tipos de estrategias reguladoras.

- El inhibidor de C1, llamado C1INH, que se une estequiométricamente a C1r y C1s inactivando el complejo C1 (19, 22).
- Evitar la formación de la C3-convertasa en las superficies celulares del hospedero, por acción de las proteínas de control del complemento CCPs (19).

- La proteína S o vitronectina se une a C5b67 induciendo una transición hidrófila; por lo que este complejo ya no podrá unirse a membranas cercanas, evitando la lisis de espectadores inocentes (Células propias) (19).
- El CD59 se une al C8 del complejo C5b678 evitando el ensamblaje de poli-C9 y del MAC en membranas (19).
- El factor H es un acelerador de la ruptura de C3 sobre superficies celulares.

Chonn y Col. estudiaron cómo influyen las propiedades de los liposomas en la activación del complemento y determinaron que cuando los liposomas están cargados negativamente activan la vía clásica del complemento, cuando están cargados positivamente activan la vía alterna del complemento y cuando no tienen ninguna carga es decir que están neutros no activan el complemento. También determinaron que los liposomas insaturados son más potentes activadores del complemento que los liposomas saturados. Este estudio sugiere que las membranas compuestas de una carga neta de fosfolípidos pueden activar el sistema del complemento. Esta observación revela la importancia de las membranas biológicas y las proteínas que regulan el complemento para proteger las células normales del ataque del complemento (26).

e) Consecuencias biológicas de la activación del complemento

Los efectos biológicos principales son:

- Muerte de bacterias y células extrañas por lisis.
- Actividad anafilotóxica. Los pequeños péptidos C3a y C5a funcionan como anafilotoxinas, que provocan un incremento en la permeabilidad vascular, contraen el músculo liso, y permiten la degranulación de células mastoides.
- Actividad quimiotáctica. Esta se refiere a la atracción de células al área de inflamación el único que contiene esta actividad es el péptido C5a.

- Regulación de actividad de neutrófilos y monocitos. El C5a puede causar un aumento en la adherencia celular, degranulación y aumento de enzimas intracelulares de granulocitos, producción de O_2 tóxico.
- Opsonización de antígenos o de inmunocomplejos, lo que facilita la destrucción por parte de fagocitos.
- Eliminación de inmunocomplejos
- Neutralización de ciertos virus (1, 19-22).

f) Ensayos hemolíticos para la valoración de la actividad sobre el sistema del complemento

Los ensayos *in vitro* están basados en la hemólisis de eritrocitos por el Complejo de Ataque a la Membrana (MAC) que se genera al activarse el sistema del complemento. Los eritrocitos actúan como células blanco y como activadores debido a que poseen abundantes antígenos de superficie que provocan reacciones con anticuerpos específicos y su lisis da lugar a la liberación de hemoglobina que se puede cuantificar. De los datos obtenidos se calcula el porcentaje de inhibición y la CI_{50} (que es la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria, bajo condiciones estandarizadas). También se usa una mezcla de suero humano normal como fuente de complemento (6, 7, 9, 22, 27).

En la activación de la vía clásica se usan eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos antieritrocitos de carnero, esta reacción antígeno-anticuerpo activa los componentes de la vía clásica del complemento presentes en la mezcla de suero humano normal, la disolución amortiguadora utilizada es el VSB⁺⁺ que contiene los cationes divalentes de Ca^{+2} y Mg^{+2} que son necesarios en la activación de dicha vía (6, 7).

La vía alterna puede ser estudiada independientemente de la vía clásica bajo condiciones donde ésta se inactiva, como por ejemplo en suero deficiente de C4, o en suero tratado con EGTA (etilen-glicol-bis (β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético) que forma un complejo con el Ca^{+2} e inactiva el C1. Para la activación de esta vía se usan

eritrocitos de conejo que poseen membranas activadas, es decir que protegen al complejo C3bBb del factor H con lo que se permite el ensamblaje de MAC. La disolución amortiguadora es el EGTA-VB (contiene EGTA y el Mg^{+2} que es necesario en la activación de esta vía)(3, 6, 7, 9, 22).

En la ruta lítica se utiliza inulina, un reactivo que al incubarlo previo al ensayo con la mezcla de suero humano normal activa la vía clásica produciendo el complejo C5b6, este complejo es el principal para la formación del complejo de ataque a membrana (MAC), el cual se ancla sobre la membrana de eritrocitos de cobayo. Para evitar la activación de la vía clásica y la vía alterna en la realización del ensayo se usa la disolución amortiguadora EDTA-VB (que contiene ácido etilen-diamino- tetraacético) el cual es quelante de Ca^{+2} y Mg^{+2} (6).

D. INMUNOMODULACION

Los agentes inmunomoduladores se pueden definir en un amplio término como sustancias que pueden amplificar o disminuir la respuesta inmune, con el objeto de defender al ser humano contra agentes patógenos o tumores. La actividad inmunomoduladora es un término colectivo que indica los efectos biológicos o celulares en la función de factores de la respuesta inmune; cada factor y cada sistema funcional involucrado en la respuesta inmune puede ser influenciado en varias vías. Tales sustancias que pueden modular mecanismos inmunológicos pueden ser considerados análogos a los agentes terapéuticos bien establecidos, es decir los diversos agentes farmacológicos que se usan para tratar estados fisiopatológicos resultantes de una disfunción en el organismo. El objetivo de usar los inmunomoduladores es regular químicamente la actividad del sistema inmune para beneficios biológicos y terapéuticos (3, 9, 28, 29, 30, 31).

Los inmunomoduladores por sus efectos pueden ser divididos en dos categorías: los inmunoestimulantes y los inmunosupresores (3, 28).

En los inmunoestimulantes su objetivo principal es aumentar la respuesta inmune; se aplica a las personas que tienen un sistema inmunitario deficiente (3, 28).

En los inmunosupresores su objetivo principal es reducir la capacidad del sistema inmune de responder contra cualquier antígeno. Tiene aplicaciones en: trasplantes de órganos, enfermedades autoinmunes y padecimientos isoimunitarios (3, 32).

E. MEDICINA TRADICIONAL

Mundialmente existe una gran variedad de opciones en lo que se refiere a medicina tradicional que en muchas ocasiones se le llama medicina alternativa. Esta en pleno siglo veintiuno sigue vigente y en auge por los beneficios que se pueden obtener y buenos resultados terapéuticos en hogares con poca accesibilidad de servicios médicos. Una de estas opciones es la Fitoterapia.

a) Fitoterapia

Es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado fisiopatológico (33-36).

Dentro de la Fitoterapia se pueden utilizar diferentes órganos de una planta como la raíz, rizoma, tallo, hojas, frutos, flores, semillas, tejidos como el corcho o la madera y gomas o resinas obtenidas por incisiones realizadas en las plantas. Estos órganos pueden contener los principios activos de las plantas, así como proteínas, enzimas, elementos naturales como hierro, cobre, flúor, etc. (35, 36).

Las plantas se usan en formas de extractos, tinturas, jarabes, infusiones, cremas, pastas, cataplasmas, baños, polvos, jabones, inhalaciones, etc., para resolver o aliviar dolencias de diversa índole (37, 38).

El uso de plantas nunca ha dejado de tener vigencia. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se enriqueció por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo. A principios del siglo pasado, el desarrollo de la química y el descubrimiento de procesos de síntesis orgánica

desencadenaron en la industria farmacéutica una nueva producción de medicamentos. Esto hizo que el uso de plantas medicinales quedara restringido en la práctica al ámbito de los remedios caseros o de tipo tradicional (etnomedicina); esta conducta se apoyó por la falta de datos experimentales que validaran científicamente el empleo de éstas. Para la fabricación de muchos productos farmacéuticos se utilizó el principio activo de determinadas plantas medicinales, creyendo que la acción de dicha sustancia se vería incrementada, al poder realizar terapias donde la cantidad de principio activo es superior al que posee la planta. Posteriormente se comprobó que las propiedades de dichas sustancias, eran menos eficaces y existía el peligro de producir intoxicaciones e intolerancias, cosa que no ocurría con la utilización de la planta entera (34, 35).

El retorno hacia el uso de la etnomedicina en la terapéutica se favoreció por:

- El descubrimiento de graves efectos secundarios en fármacos de sintéticos.
- Existe un mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de los productos derivados de plantas.
- Se han desarrollado nuevas formas de preparación y administración de los productos derivados de plantas.
- Existen métodos analíticos que garantizan un mejor control de calidad.
- En los productos fitoterapéuticos existe menos peligro por automedicación

Los remedios basados en plantas presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias o sinérgicas, que van a potenciarse entre sí de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. En algunas plantas su mecanismo de acción consiste en estimular las defensas del organismo en vez de sustituirlas. Su acción es profunda pero sin agredir al organismo. El resultado es una acción más eficaz, duradera y sobre todo, desprovista de mayores efectos secundarios (34, 37, 39).

La Fitoterapia se ha ampliado a medida que se descubren nuevas propiedades curativas y se adquiere experiencia en su uso y manejo. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas, todavía no se conocen

muchos de los principios activos y modos de acción a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. Actualmente existen en el mundo muchas especies que esperan ser descubiertas por el hombre para dar una solución a los problemas de salud que lo aquejan (35-39).

b) Uso de plantas medicinales

En Guatemala los mayas lentamente descubrieron una medicina naturista y empírica, reconocieron propiedades curativas de muchas plantas, desarrollaron amplios conocimientos sobre la flora de las tierras que habitaron, lograron seleccionar y aprovechar todas aquellas a las que les descubrieron propiedades terapéuticas (40).

La etnomedicina prehispánica logró sobrevivir al período colonial, a pesar de la influencia de los españoles, y es la que se ha conservado hasta la fecha. En el siglo pasado se le comenzó a dar la importancia que realmente merece por lo que se inició a recopilar, documentar y realizar investigaciones que apoyen y justifiquen el uso de plantas; a finales de los 80's inicios de los 90's se iniciaron a realizar investigaciones que determinaran actividades antiprotozoarias, antifúngicas antibacterianas y efectos tóxicos de las plantas utilizadas en la etnomedicina. Las instituciones que se han encargado de rescatar esta costumbre son: Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya, la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y el Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada (CEMAT).

c) Estudios de plantas inmunomoduladoras

En la actualidad el uso de plantas no solamente se basa en los conocimientos de la medicina tradicional; por el punto de vista que tiene el hombre hacia la terapéutica, ha surgido la necesidad de conocer propiedades, mecanismos de acción y beneficios que ofrece el uso de los extractos de plantas, por lo que se realiza una serie de investigaciones sistemáticas experimentales y clínicas (2).

En algunos países se han realizado investigaciones que determinan la actividad inmunomoduladora de plantas sobre el sistema del complemento para lo cual han elegido plantas que tengan propiedades: antiinflamatorias, antiparasitarias, antipiréticas,

antirreumáticas y de uso en enfermedades hepáticas. Estos estudios han concluido que tienen actividad anticomplementaria, es decir que disminuyen la actividad del sistema del complemento; esta acción se puede originar por medio de: quelación de Ca^{+2} , Mg^{+2} ó interacciones con los componentes simples de alguna vía del sistema del complemento (41-46).

La actividad inmunomoduladora de extractos de plantas puede ser expresada a través de mecanismos diferentes. Desde un punto de vista molecular, los compuestos que se conoce que modulan la respuesta inmune pueden pertenecer a cualquier clase de estructura molecular. Lo que refleja una diversidad y variedad de lugares, mecanismos y niveles de interferencia con la respuesta inmune. Los inmunomoduladores derivados de productos naturales pueden ser clasificados como compuestos de alto y bajo peso molecular. Una clasificación más específica revela compuestos activos que pertenecen a cualquiera de las siguientes clases de sustancias: carbohidratos, terpenos, esteroides, fenoles, cumarinas, aminoácidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, alcaloides y otros compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (3, 29).

El número de compuestos que pueden ser aplicados terapéuticamente demuestra que la habilidad de un compuesto para estimular el sistema inmune es dependiente de varias condiciones tales como peso molecular, solubilidad y tipo de estructura molecular (29).

d) Plantas antiparasitarias

En Guatemala la principal fuente de información para el uso y selección de plantas en la investigación es por conocimientos de la medicina tradicional es decir la derivada de los textos clásicos de medicina tradicional, intervenciones y consultas orales a naturistas, curanderos y personas que practican los sistemas de medicina tradicional y folklóricos (4, 47, 48). De plantas seleccionadas se han hecho extractos y se han realizado ensayos para determinar la actividad antiprotozoaria intracelular. A continuación se describen aquellas que han dado resultado positivo.

1. *Lippia graveolens* HBK (Orégano, Mejorana)

Pertenece a la familia Verbenaceae. Arbusto delgado de hasta 2 m de alto, las ramas con pubescencia corto-pilosa; hojas con pecíolos de 5-10 cm de largo, las láminas oblongas a elípticas u ovado a ovado-oblongas, 2-4 cm de largo, usualmente obtusas o redondeadas en el ápice, algunas veces agudo, redondeadas o subcordadas en la base, densamente suave-pilosas en el haz, suave al tacto, glandular y densamente tomentosa o pilosa en el envés, el margen finamente crenado; pedúnculos 2-6 en la axila de la hoja, 4-12 cm flores en espigas subglobosas a oblongas (49).

Es nativa desde Baja California y Sur de Texas hasta Nicaragua, se encuentra en bosque secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350 metros sobre el nivel del mar (49).

En la etnomedicina se usa la decocción o infusión de hojas por vía oral para tratar anemia, afecciones gastrointestinales y respiratorias, hidropesía e ictericia. La decocción en leche se usa para tratar asma y bronquitis. Tópicamente se aplica para la cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones. En cataplasma se utiliza para madurar abscesos y calmar neuralgias. La planta fresca macerada en aceite se aplica a los dolores reumáticos. Se le atribuye propiedades de antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, cicatrizante, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estomáquica, expectorante, febrífuga, pectoral, sudorífica, tónica y antifúngico (49).

Se ha demostrado que tiene actividad antibiótica (contra *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*), y actividad antiprotozoaria (contra *Leishmania mexicana*, epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*) (49, 50, 51).

2. *Neurolaena lobata* L.R.Br (Mano de Lagarto, Tabaquillo, Tres puntas)

Pertenece a la familia Asteraceae/Compositae. Hierba erecta, de 1-4 m de alto, poco ramificada, tallos estriados, sulcados pubescentes con ramificaciones escasas. Hojas cortas pecioladas o sésiles, glabras, alternas, acuminadas o agudas a la base, 5-30 cm de largo, dentadas, corto-pilosas al envés. Inflorescencia, corolas anaranjado-amarillas (49).

Es nativa desde el sur de México hasta el Norte de Colombia y Venezuela incluyendo las islas del Caribe. Se distribuye desde el nivel del mar hasta 1,450 m de altura (49).

En la etnomedicina se usa la decocción de hojas por vía oral para la diabetes, diarrea, paludismo, fiebre, dolor de estómago, enfermedades de la piel, anemia, afecciones hepáticas, hipertensión, dismenorrea y Gonorrea (49).

Las actividades biológicas que se han demostrado son hipoglicemiante y actividad antiprotozoaria (contra trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania mexicana*, y *Leishmania brasiliensis*, *Trichomona vaginalis*). Es inactivo como agente antitumoral, en la actividad linfoproliferativa y tampoco presentó actividad contra *Aspergillus flavus*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* (5, 49, 52, 53, 54).

3. *Petiveria alliacea* L (Apacín)

Pertenece a la familia Phytolaccaceae. Es una planta americana aromática, de unos 30 a 100 cm de alto, tallo erecto poco ramoso, pubescente; hojas simples, alternas, casi lampiñas, por lo general elípticas y granulosas hacia el pecíolo, de 6 a 15 cm de largo por 3 a 5 de ancho; y espiga terminal con flores hermafroditas pequeñas blanquecinas. Su hábitat abarca desde la Florida, México, Antillas hasta gran parte de Sudamérica (55).

Las actividades biológicas de la planta abarcan el campo de la infectología, inmunología y la oncología (49, 55).

En la infectología se encuentra la actividad antimalárica frente a cepas de *Plasmodium falciparum*; actividad antimicótica frente a cepas *Epidermophyton floccosum*; no ha demostrado eficacia contra cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton spp.*, *Candida albicans*, *Trichomona vaginalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella typhi*. En forma aislada el Bencil-2-hidroxi-etil-trisulfuro ha demostrado actividad contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El aceite esencial ha demostrado acción

insecticida contra ejemplares adultos de algunas variedades de mosquitos y actividad repelente contra la polilla de ropa (55, 56, 57).

En el campo de la inmunología el extracto de raíz en dosis de 1 mg aplicada localmente ha demostrado actividad antiinflamatoria, la infusión de raíz administrada oralmente, en dosis de 750 mg/k ha demostrado acción analgésica periférica, mientras que dosis de 1g/k ha demostrado efecto analgésico central (55).

En la oncología no ha demostrado actividad contra sarcoma (S180 y S37), carcinoma de Erlich y adenocarcinoma mamario producida en ratones albinos. Estudios informan de casos de leucemia tratados exitosamente con esta planta. El mecanismo de acción *in vitro* ha demostrado: producción de interferón en ratones, estimula la actividad de células asesinas en ratones, incremento del índice fagocítico de granulocitos humanos. Por otra parte, el bencil-2-hidroxi-5-etil trisulfuro se ha relacionado con una acción estimulante del sistema retículo-endotelial (49, 55, 58).

El extracto de hojas tiene actividad hipoglicemiante, el extracto metonólico de la raíz ha demostrado actividad profiláctica y terapéutica en casos de enfermedad hepática experimental. Posee actividad estimulante uterina débil (55).

En la etnomedicina se usa la decocción de hojas por vía oral para resfriados, afecciones gastrointestinales, alteraciones de las vías respiratorias (amigdalitis, asma, bronquitis, catarros, tos ferina), calambres, inflamaciones de la vejiga, para dolor de muelas (se hacen buches tibios con lo preparado); se considera que tiene propiedades diuréticas, sudoríficas, expectorantes, antiespasmódicas, depurativas, se ha usado como vermífuga, emenagoga, abortiva, en el reumatismo, parálisis, histeria, hidrofobia, como antiinflamatorio, cicatrizante local, antiinfeccioso, analgésico (la hoja atada directamente en la cabeza alivia el dolor de cabeza) y calambres (49, 55).

4. *Rhizophora mangle* L. (Mangle)

Pertenece a la familia Rhizophoraceae. Arbol o arbusto que alcanza alturas de 40 m y mide más de un metro de diámetro, tronco derecho con raíces zancudas, de copa redondeada, perenne; corteza gris clara o blanquecina, lisa o fisurada, roja en su interior;

hojas simples, coriáceas y perennes, aglomeradas en la punta de las ramas jóvenes, verde oscuras en el haz y más clara en el envés, donde presenta puntos negros; flores de 2.5 cm de diámetro, cáliz amarillo-verdoso y pétalos lanceolados, blancos, más morenos en la punta, con 8 estambres (59).

Crece en regiones tropicales y subtropicales, en altitudes de zonas costeras y estuarios, pueden vivir en suelos con alta concentración de sal, drenaje pobre, áreas inundadas, irregularmente inundadas por la marea o con filtraciones de agua dulce.

Generalmente se usa para obtener leña, carbón, madera, taninos, resinas, y para la fabricación del rayón. En la etnomedicina tiene reputación de tener propiedades astringentes y desinfectantes (59).

Se ha demostrado que tiene actividad antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus*), actividad antimicótica (contra *Trichophytum rubrum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Cryptococcus neoformans*) antiprotozoaria (contra *Leishmania mexicana*, epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*) (60, 61, 62).

5. *Solanum americanum* Miller (Hierba Mora, Macuy, Quilete)

Pertenece a la familia Solanaceae. Hierba de 1 m de alto, tallo pubescente. Hojas en pares o solitarias, 3-14 cm de largo, lanceoladas, ápice agudo. Inflorescencia internodal, racemiforme, pedunculada, pocas flores en cálices. Se encuentra distribuido en toda América crece en matorrales y sembrados a alturas que van de 350-1,500 metros sobre el nivel del mar (49, 63).

Como medicina tradicional se usa la decocción de hojas por vía tópica para el tratamiento de afecciones dermatomucosas (abscesos, dermatitis, eczema, erisipela, exantema, heridas, leucorrea, llagas, mezquinos, pústulas, tiña, úlcera y vaginitis). Por vía oral se usa en el tratamiento de asma amigdalitis, anemia, cirrosis, cólico, diarrea, dolor de muelas, escorbuto, estreñimiento, gastritis, hinchazón meningitis, nerviosismo, paludismo, presión alta, retención urinaria, reumatismo, tos ferina y úlcera gástrica (49, 63).

Se le atribuye propiedad aperitiva, calmante, depurativa, diurética, desinflamante, emoliente, febrífuga, mineralizante, reconstituyente, sedante vulneraria (63).

Se ha demostrado que tiene actividad antibiótica (contra *S. aureus*), antimicótica (contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*), antiprotozoaria (contra *Leishmania mexicana*, epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* y *Entamoeba histolytica*), espasmolítica y verrucosida (49, 64, 65).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las actitudes discriminatorias que se han tenido por mucho tiempo hacia las plantas medicinales no están justificadas por lo que es adecuado realizar una evaluación de los potenciales terapéuticos de los extractos de dichas plantas. En nuestro país el uso de extractos vegetales con fines terapéuticos como medicina alternativa es muy frecuente por lo que surge la necesidad de investigar posibles mecanismos de acción.

El extracto de una planta es un conjunto de estructuras moleculares complejas, por lo que poseen una amplia variedad de propiedades curativas y cada estructura puede tener diferentes mecanismos de acción los cuales pueden ser sinérgicos entre sí. La mayoría de estos mecanismos son desconocidos y uno de los cuales podría ser la modulación de la respuesta inmune, que incluye el sistema de complemento, que juega un papel importante en la defensa contra infecciones.

En Guatemala en el siglo pasado se iniciaron investigaciones para determinar propiedades antiparasitarias, antifúngicas y antimicrobianas de una gran variedad de extractos de plantas. Hasta la fecha se estudiaron aproximadamente treinta extractos de plantas que se consideraban como antiparasitarias intracelulares, resultando positivas siete de ellas. En la actualidad se desea establecer otro tipo de actividad o mecanismo de acción de los extractos de plantas positivas y es determinar si éstas activan el sistema del complemento, que conduce a la formación de MAC (Complejo de Ataque a la Membrana) y por lo tanto la lisis celular.

Lo que se pretende con esta investigación es establecer y estandarizar las técnicas de ensayos hemolíticos para determinar la actividad inmunomoduladora sobre el sistema de complemento y realizar un tamizaje de esta actividad con extractos de cinco plantas que han mostrado actividad antiprotozoaria.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

1. Demostrar actividad inmunomoduladora *in vitro* de extractos etanólicos de cinco plantas.

B. ESPECIFICOS:

1. Estandarizar técnicas de ensayos hemolíticos para determinar la actividad inmunomoduladora sobre el sistema del complemento.
2. Identificar de los extractos etanólicos de cinco plantas, cuales tienen la capacidad de modular la vía clásica, la vía alterna y la ruta terminal del sistema del complemento, modificando de tal forma la respuesta inmune.
3. Determinar la concentración a la que los extractos vegetales expresan capacidad inmunomoduladora sobre la vía clásica, la vía alterna y la ruta terminal del sistema del complemento

VI. HIPÓTESIS

De los extractos etanólicos de cinco plantas que tienen actividad contra protozoos intracelulares, por lo menos uno tiene actividad inmunomoduladora en el sistema del complemento ya sea por la vía clásica, alterna o ruta terminal.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO

Extractos etanólicos de cinco plantas que tienen actividad antiprotozoaria intracelular.

a) Muestra

Extractos etanólicos de hoja de *Lippia graveolens*, hoja de *Neurolaena lobata*, hoja y raíz de *Petiveria alliacea*, corteza de *Rhizophora mangle* y hoja de *Solanum americanum*.

B. RECURSOS:

a) Humanos

1. Asesores

Licda. Ana Margarita Paz de Ramírez

Lic. Armando Cáceres

2. Investigador

Br. Annabella Osorio Velásquez

b) Físicos

1. Reactivos

Mezcla de sueros humanos (MSH)

Mezcla de sueros humanos inactivos (30 minutos a 56° C)

Solución salina

Agua destilada

Agua desmineralizada

Extractos etanólicos de cinco plantas

Eritrocitos de carnero, de conejo y de cobayo

Amboceptor (anticuerpos contra eritrocitos de carnero Dilución 1:100)

Inulina

Disolución amortiguadora salina de veronal concentrado cinco veces ($5 * \text{VSB}^\circ$), éste sirvió como solución stock para la preparación de las disoluciones amortiguadoras:

(i) VSB° , no contiene aditivos.

(ii) VSB^{++} , contiene 0.5 mM de Mg^{2+} y 0.15 mM Ca^{2+} .

(iii) EGTA-VB, contiene 2.5 mM de Mg^{2+} y 8 mM de EGTA (etilen-glicol-bis (β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético).

(iv) EDTA-VB, contiene 10 mM de EDTA (ácido etilen-diamino tetraacético).

2. Productos plásticos

Placas estériles de microtitulación de fondo plano

Placas estériles de microtitulación de fondo en U

Tubos eppendorf de 0.5 ml

3. Productos de vidrio

Pipetas Pasteur

Hemocitómetro de Neubauer

Tubos de ensayo de 25 ml

4. Equipo

Centrífuga

Balanza

Incubadora 37°C y 56°C

Lector de Elisa

Pipetas de $50\mu\text{L}$, $100\mu\text{L}$, $200\mu\text{L}$, $1000\mu\text{L}$

Autoclave

c) **Institucionales**

Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA

Laboratorio Clínico Santa Elisa

C. PROCEDIMIENTO

Según versión modificada del microensayo de la vía clásica y vía alterna descrito por Klerx y Col. (1983). Para la ruta lítica es una versión modificada de Bootsma y Col. (1992) (6, 7).

a) Ensayo

1. Determinación hemolítica para la actividad de la vía clásica del complemento
 - i. Sensibilización de eritrocitos de carnero
 - Se lavó tres veces los eritrocitos de carnero con solución salina.
 - Se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración de 4×10^8 células/ml con la disolución amortiguadora VSB⁺⁺.
 - Se sensibilizaron los eritrocitos, mezclando 1 ml de amboceptor (dilución 1:100) con 7 ml de VSB⁺⁺ y 8 ml de la suspensión de eritrocitos, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
 - Se lavó tres veces los eritrocitos de carnero sensibilizados (ShEA) con VSB⁺⁺.
 - Se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración de 1.15×10^8 células/ml
 - Se dejaron los ShEA en hielo hasta su utilización.
 - ii. Colocación de las muestras en tubos eppendorf (ver figura No.1)
 - Se agregó 100 μ l de muestra en el tubo respectivo y se realizó las diluciones seriadas.
 - iii. Preparación de controles para la medición de actividad sérica (ver figura No. 1)
 - Se agregó 50 μ l de VSB⁺⁺ a H1-H6 (actividad de suero)
 - Se agregó 100 μ l de VSB⁺⁺ a las filas H7-H9 (hemólisis al 0%)
 - Se agregó 100 μ l de agua desmineralizada a H10-H12 (hemólisis al 100%)
 - iv. Preparación de la dilución del suero y preincubación:

- Se agregó 50 μ l de la solución de suero inactivo (63 μ l de suero inactivo mezclado con 5 ml de VSB⁺⁺) a los tubos H4-H6 y blancos de muestra.
- Se mezcló 125 μ l de suero humano normal con 10 ml de VSB⁺⁺ y se agregó 50 μ l de esta solución a los tubos control y muestrás problema
- Se taparon los tubos y se preincubaron a 37°C por 30 minutos

FIGURA No. 1: esquema de la colocación de muestras y controles

	Mx 1			Mx 2			Mx 3			Mx 4		
	SA	SA	SI	SA	SA	SI	SA	SA	SI	SA	SA	SI
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

CONTROLES

Celdas H1-H3
miden acti-
vidad de suero

Celdas H4-H6 miden
Blanco de suero

Celdas H7-H9 miden
Hemólisis al 0%

Celdas H10-H12
miden hemólisis al
100%

Mx1 = muestra etanólica 1

Mx 2 = muestra etanólica 2

Mx 3 = muestra etanólica 3

Mx 4 = muestra etanólica 4

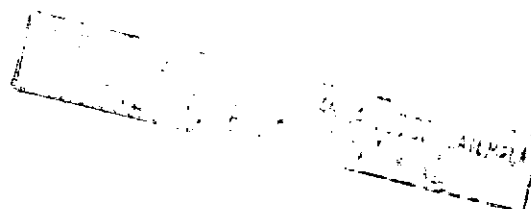
SA = columnas donde se agrega suero activo

SI = columnas donde se agrega suero inactivo

v. Incubación:

- Después de la preincubación se agregó 50 μ l de la suspensión ShEA a cada tubo
- Se Incubó a 37°C por 60 minutos.

vi. Medición de la hemólisis



- Se añadió 200 µl de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano
- Se transfirió 50 µl de los sobrenadantes a las placas de fondo plano respectivamente.
- Se midió la DO (densidad óptica) a 405 nm en un lector de ELISA

vii. Cálculo

- Determinación de la Actividad Sérica como % de lisis

$$\% \text{ de lisis} = \frac{\text{DO}_{405} \text{ promedio (H1, H2, H3)} - \text{DO}_{405} \text{ promedio (H4, H5, H6)}}{\text{DO}_{405} \text{ promedio (H10, H11, H12)} - \text{DO}_{405} \text{ promedio (H7, H8, H9)}} \times 100$$

- Actividad Inhibitoria de la muestra Vrs. el control

Ejemplo: para la concentración más alta de la muestra (A1, A2, y A3)

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{DO}_{405} \text{ promedio (A1, A2)} - \text{DO}_{405} \text{ (A3)}}{\text{DO}_{405} \text{ promedio (H1, H2, H3)} - \text{DO}_{405} \text{ promedio (H4, H5, H6)}} \times 100$$

- Cálculo de CI₅₀ (concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria): se realizó la gráfica de porcentaje de Inhibición versus Log Concentración, con la recta de regresión obtenida (al menos 4-5 valores significativos) se extrapola el valor del 50% de inhibición para obtener CI₅₀

2. Determinación hemolítica para la actividad de la vía alterna del complemento:

i. Preparación de la suspensión de eritrocitos:

- Se lavaron los eritrocitos de conejo tres veces con solución salina
- Se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración de 1.15×10^8 células/ml con EGTA-VB.
- Se colocó la suspensión de eritrocitos en hielo hasta su utilización.

ii. Colocación de muestras en solución en tubos eppendorf (ver figura No.1)

- Se agregó 100 μ l de muestra en los tubos respectivos y se realizaron diluciones seriadas con EGTA-VB.

iii. Preparación de controles para la medición de actividad sérica (ver figura No.1)

- Se agregó 50 μ l de EGTA-VB a H1-H6 (actividad sérica)
- Se agregó 125 μ l de EGTA-VB a las filas H7-H9 (control de hemólisis 0%)
- Se agregó 125 μ l de agua desmineralizada a H10-H12 (control de hemólisis 100%)

iv. Preparación de la dilución del suero y preincubación:

- Se agregó 25 μ l de la solución de suero inactivo (se mezcló 500 μ l de suero inactivo con 1000 μ l de EGTA-VB) a los tubos H4-H6 y blancos de muestra.
- Se mezcló 1 ml de suero humano normal con 2 ml de EGTA-VB y se agregó 25 μ l de esta solución a los tubos control y muestras problema.
- Se taparon los tubos y se preincubaron por 30 minutos a 37°C

v. Incubación:

- Después de la preincubación, se agregó 25 μ l de la suspensión de eritrocitos de conejo a cada tubo.
- Se incubó a 37°C por 30 minutos.

vi. Medición de la hemólisis y cálculo:

- Ver inciso vi y vii del ensayo de la determinación hemolítica para la actividad de la vía clásica del complemento.

3. Determinación hemolítica para la actividad de la ruta terminal del complemento

i. Preparar suspensión de eritrocitos:

- Se lavó tres veces los eritrocitos de cobayo con solución salina
- Se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración de 1.15×10^8 células /ml con EDTA-VB.

- Se colocó en hielo la suspensión de eritrocitos hasta su utilización.
- ii. Preparación del complejo C5bC6
- En un tubo de 12 ml se colocó 500 μ l de la MSH, 500 μ l de VSB^o y 2.5 mg de inulina.
 - Se incubó el tubo a 37 °C por 30 minutos
 - Posteriormente, se diluyó la suspensión anterior 1:12 con EDTA-VB
- iii. Colocación de muestras en tubos eppendorf (ver figura No. 1)
- Se agregó 100 μ l de la muestra en los tubos respectivos y se realizó diluciones seriadas.
- iv. Preparación de los controles para la medición de actividad sérica
- Se agregó 50 μ l de EDTA-VB a H1-H6 (H1-H3 para la determinación de la actividad del suero; H4-H6 son el blanco suero).
 - Se agregó 150 μ l de EDTA-VB a las filas H7-H9 (control de hemólisis 0%)
 - Se agregó 150 μ l de agua desmineralizada a H10-H12 (control de hemólisis 100%)
- v. Incubación:
- Para la preparación del blanco reactivo, se mezcló 500 μ l de suero inactivo con 11.5 ml de EDTA-VB y se agregó 100 μ l de esta solución a H4-H6 y muestras blanco.
 - Se agregó 100 μ l de la solución preparada en el numeral ii. a los tubos control y muestras problemas
 - Se agregó 25 μ l de la suspensión de eritrocitos de cobayo a cada tubo.
 - Se taparon los tubos y se incubaron a 37°C por 60 minutos
- vi. Medición de la hemólisis
- Ver inciso vi y vii del ensayo de la determinación hemolítica para la actividad de la vía clásica del complemento.

4. Reto hemolítico:

Los ensayos que se describieron anteriormente usan eritrocitos como células blanco del complemento, los cuales tienen abundantes antígenos de superficie que provocan reacciones con los anticuerpos específicos, y su lisis da lugar a la liberación de hemoglobina que se puede cuantificar. También se usa una mezcla de suero humano normal como fuente de complemento.

Un resultado se consideró positivo cuando el extracto produjo un 50% de aumento o un 50% de disminución en la concentración de hemoglobina comparado frente al resultado de la actividad sérica y la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria (CI₅₀) fue menor a 15 µg/ml

b) Diseño de Estudio

1. Muestreo

Forma: no probabilística

Tamaño: 6 extractos etanólicos. (hoja de *Lippia graveolens*, hoja de *Neurolaena lobata*, hoja y raíz de *Petiveria alliacea*, corteza de *Rhizophora mangle* y hoja de *Solanum americanum*).

VARIABLES DE INTERÉS: hemólisis

2. Fase experimental:

Número de grupos: 6 (con dosis única: 1 mg/ml.)

Grupo A: extracto etanólico de *L. graveolens* (hoja)

Grupo B: extracto etanólico de *N. lobata* (hoja)

Grupo C: extracto etanólico de *P. alliacea* (hoja)

Grupo D: extracto etanólico de *P. alliacea* (raíz)

Grupo E: extracto etanólico de *R. mangle* (corteza)

Grupo F: extracto etanólico de *S. americanum*

Grupo G: controles: tubos de 1-3: suero activo (control de actividad sérica)

tubos de 3-6: suero inactivo (blanco de control de actividad sérica)

tubos de 7-9: disolución amortiguadora (control negativo, hemólisis 0%)

tubos de 10-12: agua desmineralizada (control positivo, hemólisis 100%)

Quedando distribuido así:

R ⁽¹⁾	R1			R2			R3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○

R⁽¹⁾ = repeticiones

3. Determinación de la CI₅₀ (concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria)

De los extractos etanólicos de plantas que presentaron un 50% de aumento o un 50% de disminución en la concentración de hemoglobina comparado frente al resultado de la actividad sérica se les determinó la CI₅₀, variando la concentración en 166.67, 55.5, 18.51, 6.17, 2.05, 0.68 µg/ml.

4. Análisis de Resultados:

Las respuestas medidas son

Positiva: si el extracto aumentó (actividad estimuladora) o disminuyó (actividad inhibidora) en un 50% la concentración de hemoglobina comparado frente al resultado de la actividad sérica y si la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria (CI_{50}) fue menor a 15 $\mu\text{g/ml}$.

Negativa: si la concentración de hemoglobina producida por el extracto quedó inalterada comparada frente al resultado de la actividad sérica o la CI_{50} fue mayor a 16 $\mu\text{g/ml}$.

VIII. RESULTADOS

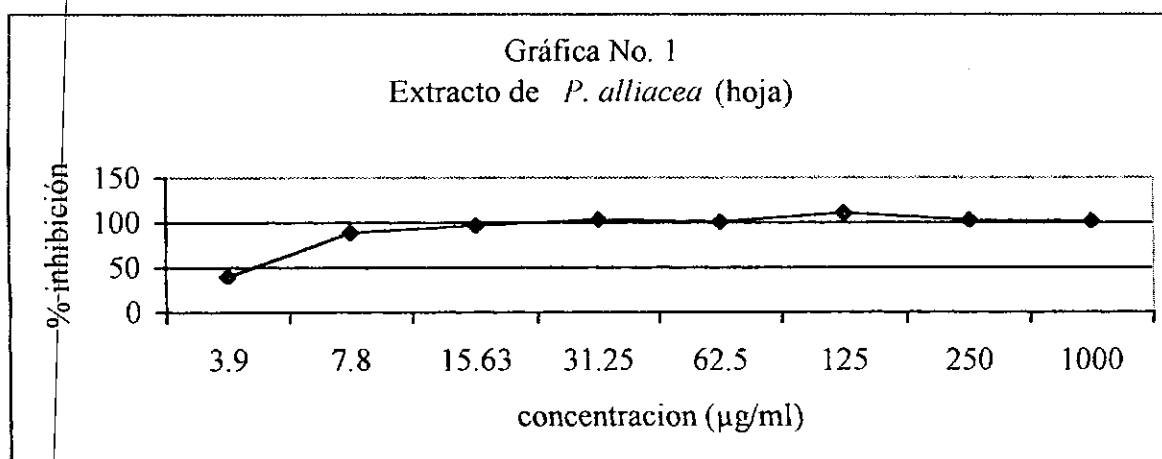
A. Actividad inhibitoria de los extractos etanólicos sobre el sistema del complemento

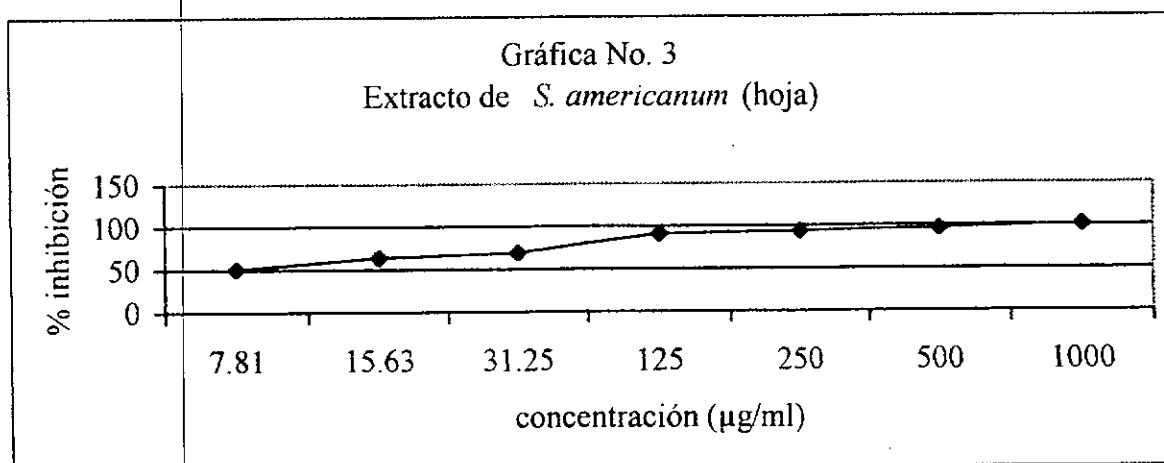
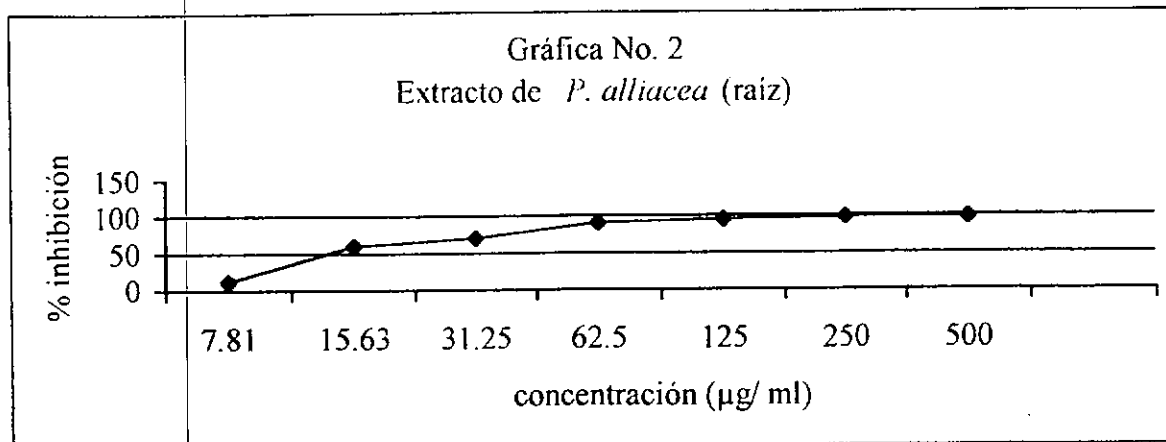
a) Actividad de la vía clásica

En las gráficas se observa que conforme aumenta la concentración de la muestra el porcentaje de inhibición va aumentando, demostrando una correlación Dosis-Efecto. El porcentaje de inhibición es inversamente proporcional a la concentración de hemoglobina producida por el extracto, por lo que cuanto más concentración de la muestra existe, más protegido se encuentra el eritrocito de la hemólisis causada por la activación del complemento.

1) Extractos de plantas con resultado positivo

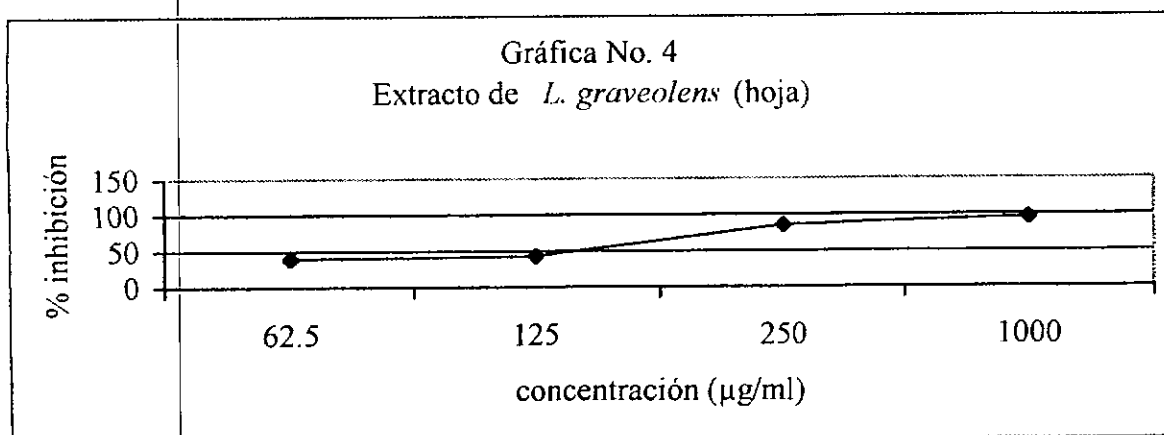
Los extractos que se mencionan a continuación presentaron actividad anticomplementaria o bloqueo de la activación de la vía clásica y la concentración del extracto a la que se obtuvo un 50% de lisis eritrocitaria (CI₅₀) fue menor a 15 µg/ml.

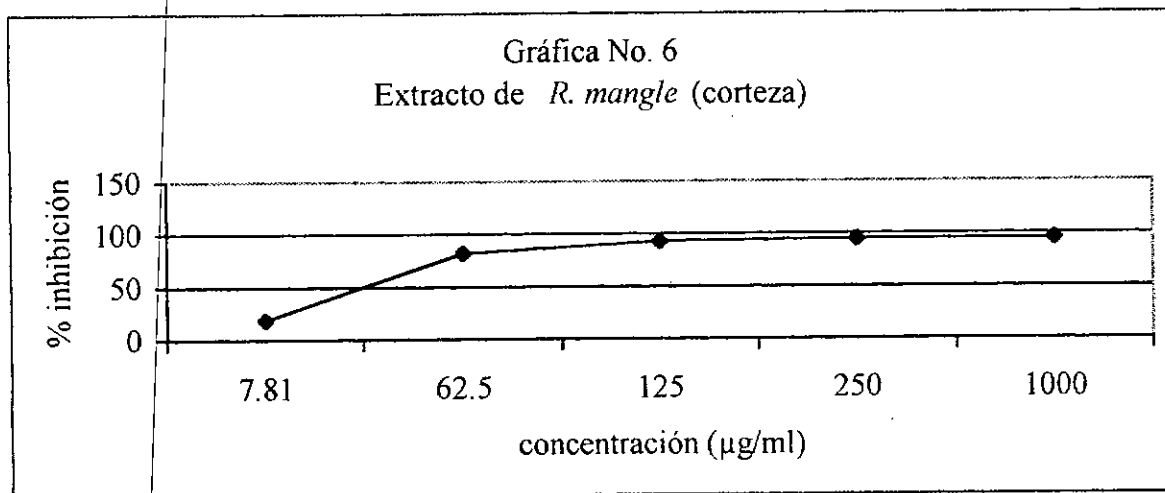
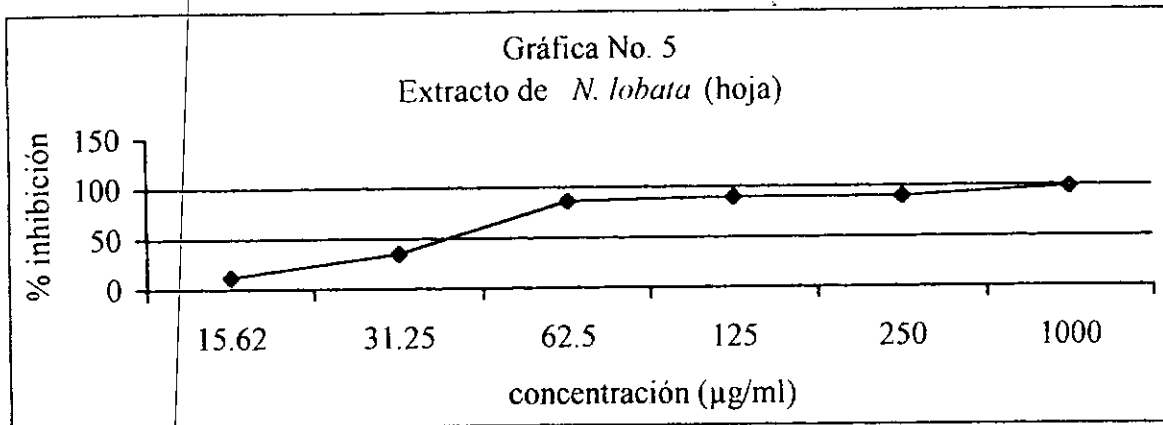




2) Extractos de plantas con resultado negativo

Los extractos que se mencionan a continuación tienen actividad anticomplementaria con Clso mayor a 16 µg/ml.



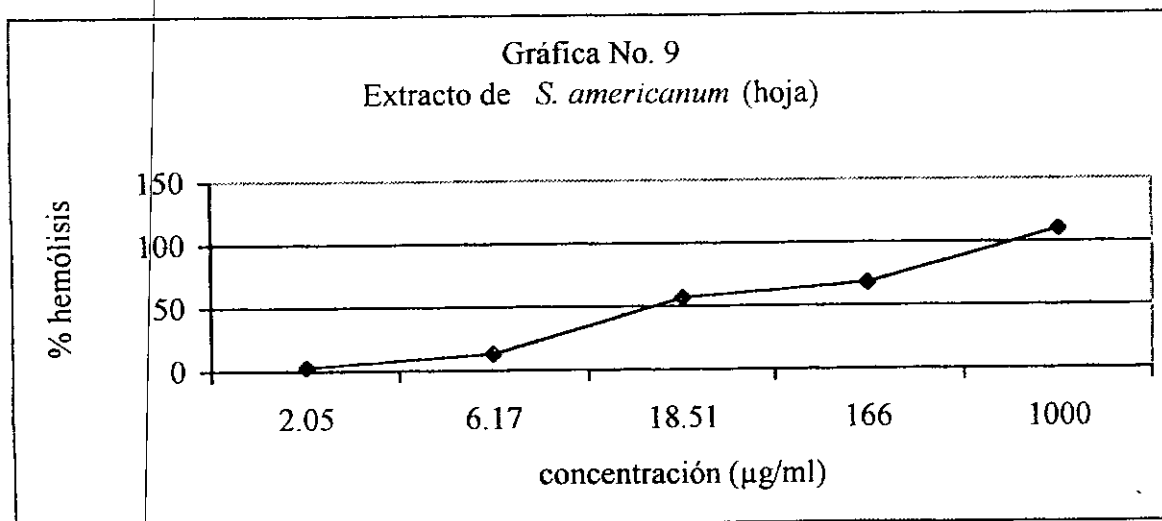
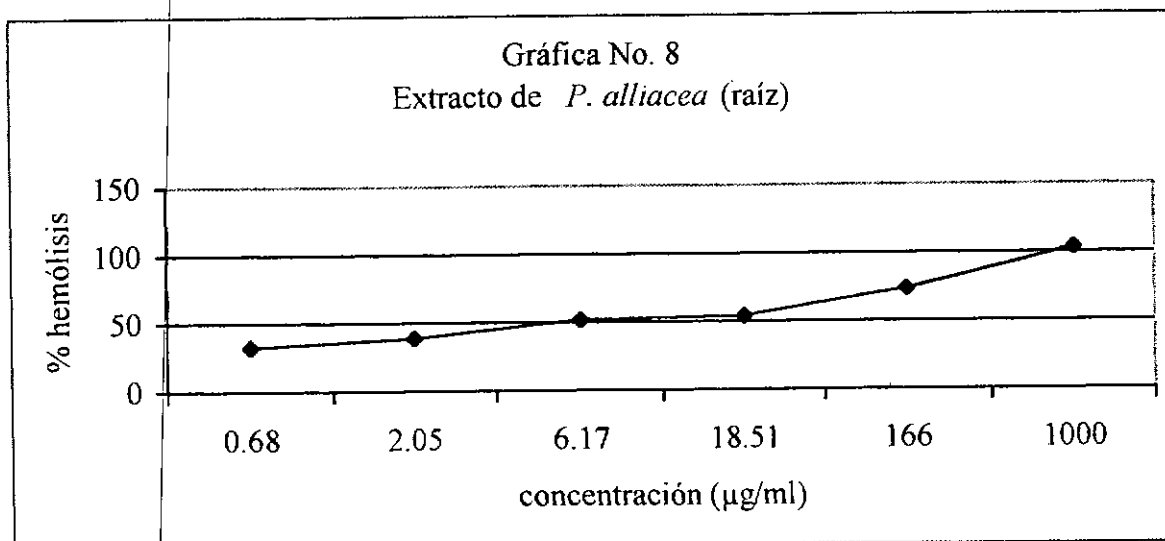
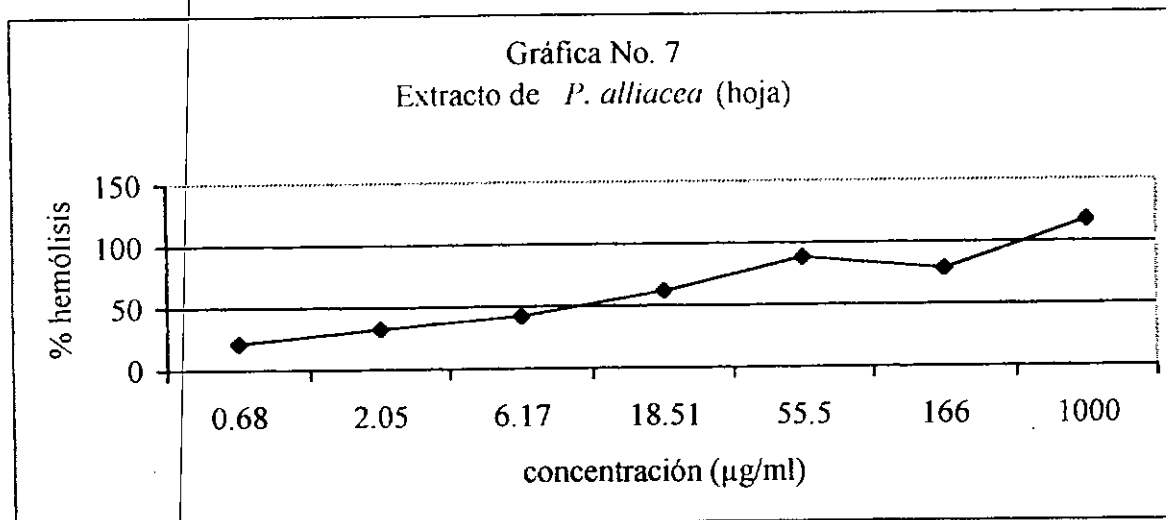


b) Actividad de la vía alterna:

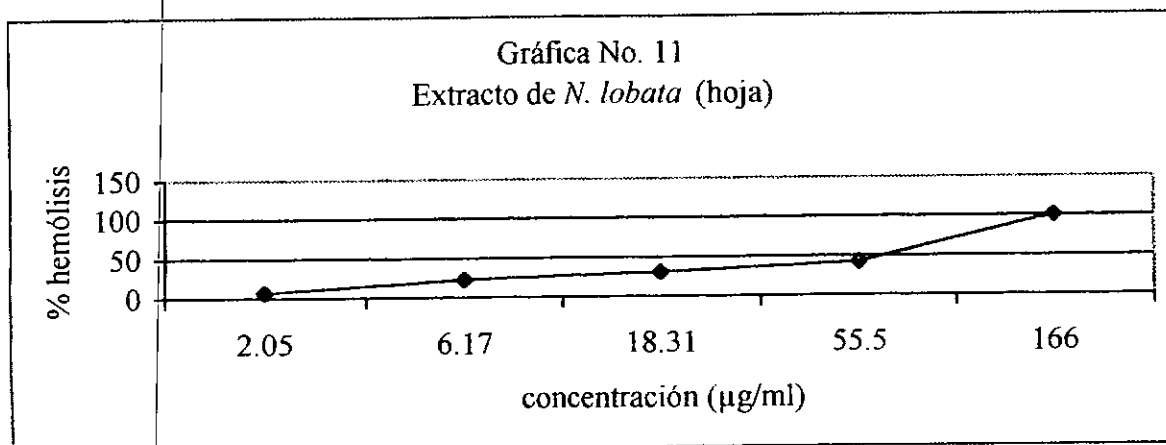
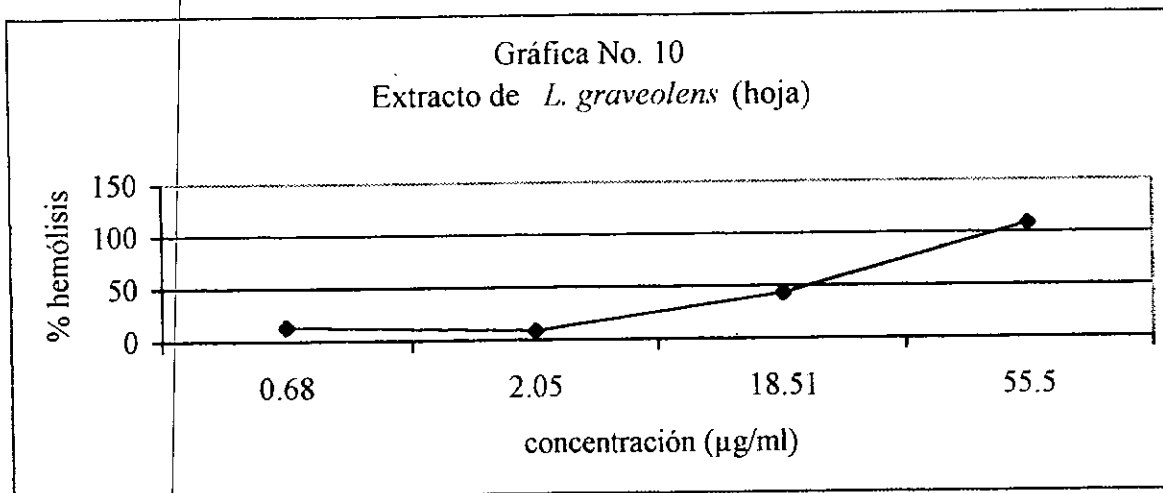
En las gráficas se observa que conforme aumenta la concentración de la muestra, también aumenta el porcentaje de hemólisis, demostrando una correlación Dosis-Efecto. El porcentaje de hemólisis es proporcional a la concentración de hemoglobina producida por el extracto, es decir que cuanto más concentración de la muestra existe más hemólisis es causada por la activación del complemento.

1) Extractos de plantas con resultado positivo para la activación de la vía alterna

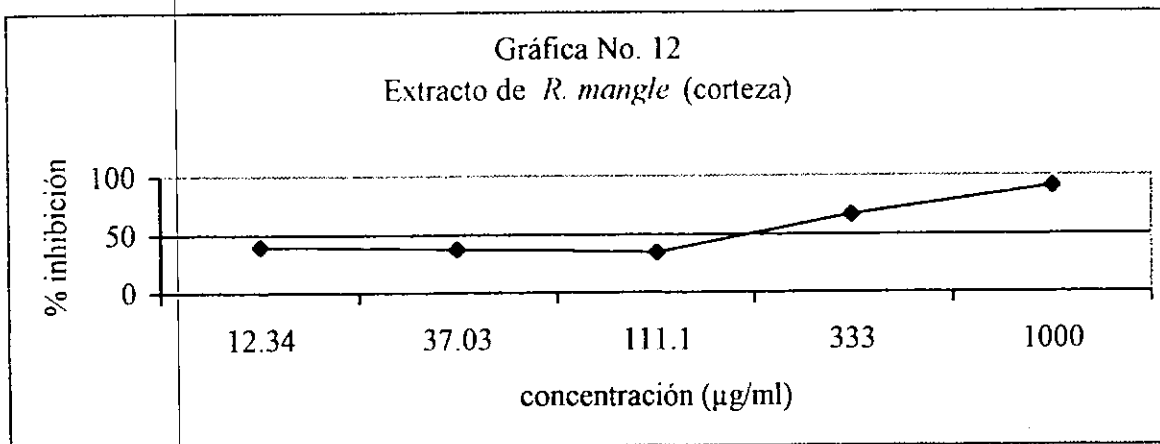
Los extractos que se mencionan a continuación presentaron una CI_{50} menor a 15 µg/ml.



- 2) Extractos de plantas con resultado negativo para la activación de la vía alterna
 Los extractos que se mencionan a continuación presentaron una CI_{50} mayor a 16 $\mu\text{g/ml}$.



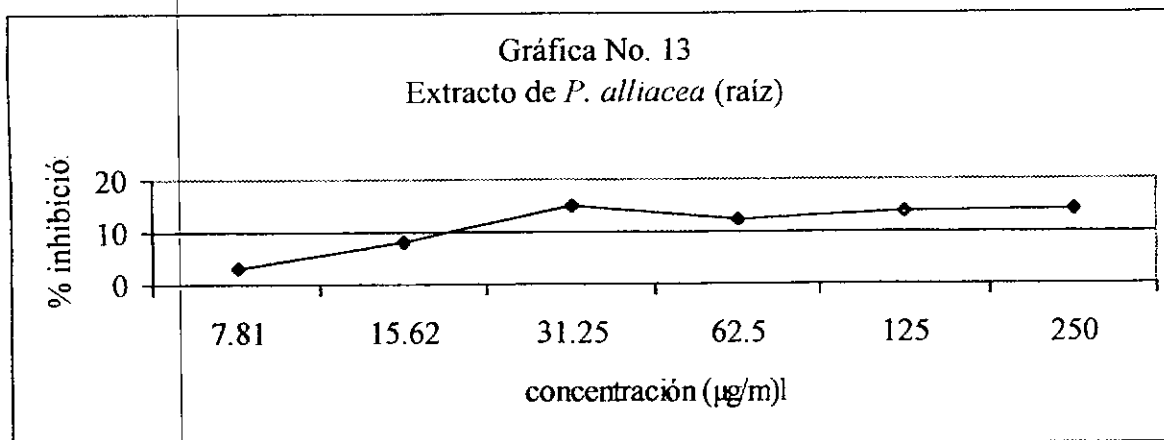
- 3) Extracto de planta con resultado negativo para la inhibición de la vía alterna
 El extractos que se mencionan a continuación presentó una CI_{50} mayor a 16 $\mu\text{g/ml}$.

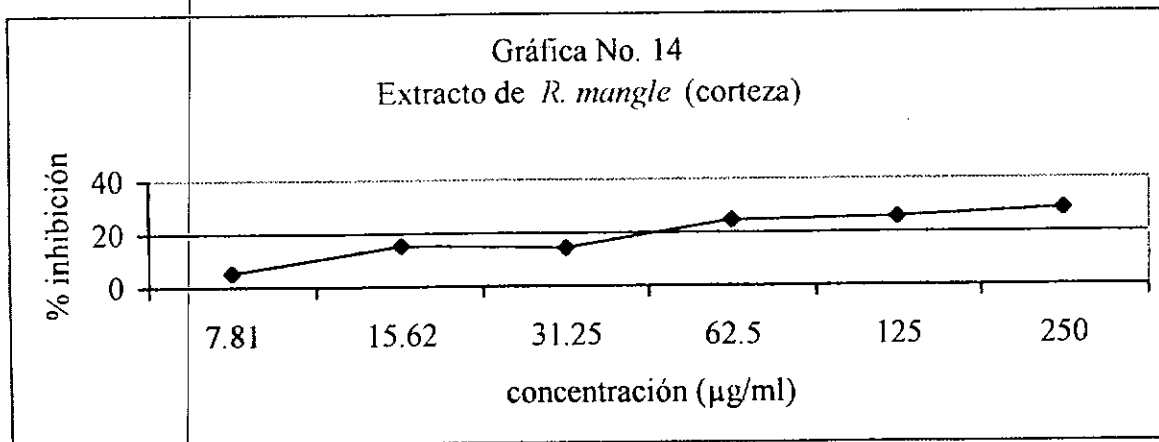


c) **Actividad de la ruta terminal**

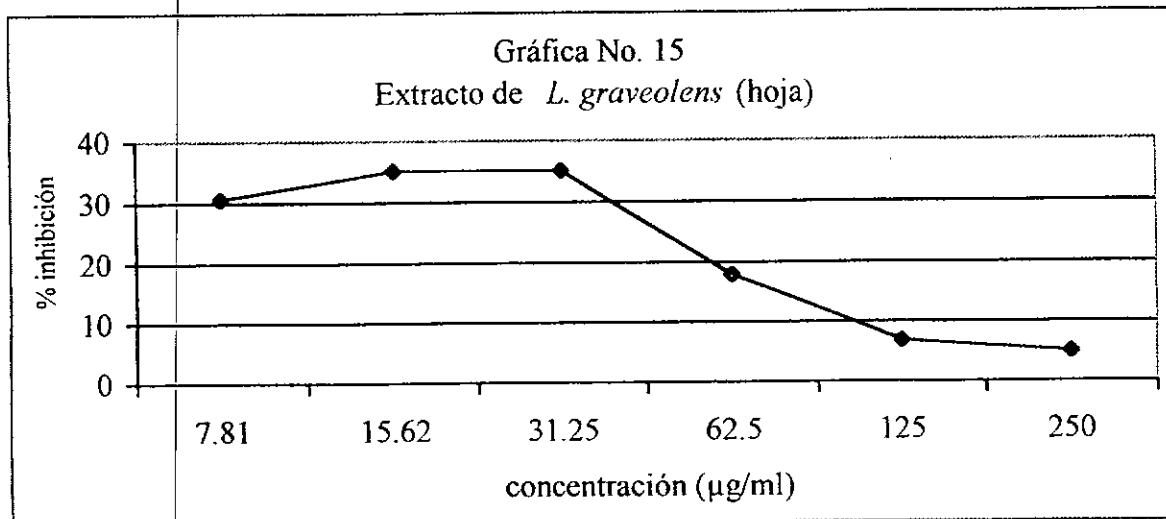
En las gráficas se observa que el porcentaje de inhibición no es mayor al 50% aunque aumentó la concentración de la muestra el porcentaje se mantuvo o en algunos casos disminuyó, por lo que se observa relación Dosis-Efecto en las gráficas No. 13 y No. 14 y una ausencia de ésta en las gráficas No. 15 a No. 18. El porcentaje de inhibición es inversamente proporcional a la concentración de hemoglobina producida por el extracto, por lo que no fue significativa la hemólisis causada por activación del complemento. Ninguno de los extractos activó la ruta terminal del complemento.

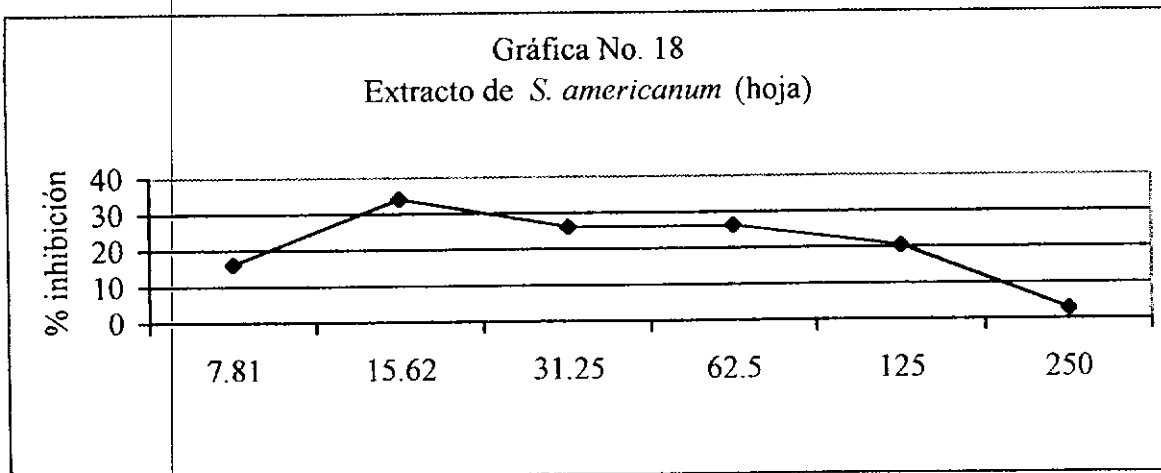
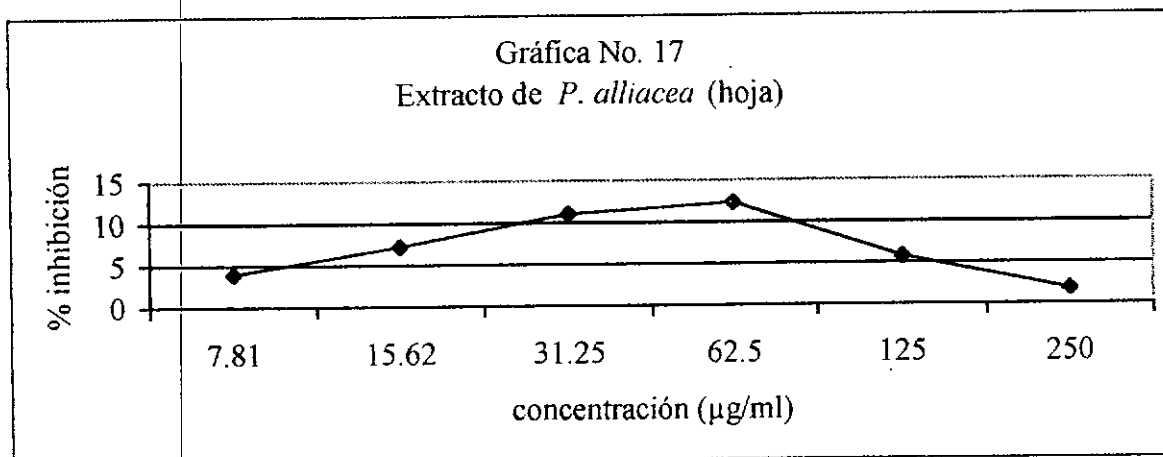
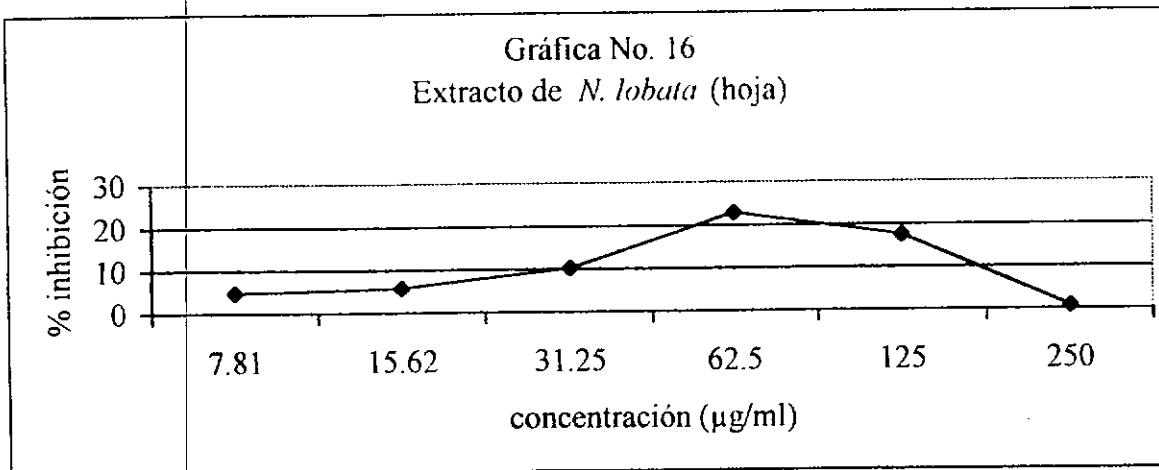
1) **Extractos que tienen relación Dosis-Efecto**





2) Extractos que no tienen relación Dosis-Efecto





B. Actividad de los extractos en estudio

De acuerdo a las gráficas de la actividad inhibitoria de la muestra y al análisis de datos se realizó la siguiente tabla de resultados.

Tabla No. 1
Actividad inmunomoduladora de los extractos etanólicos

Nombre científico	Vía clásica	Vía alterna	Ruta terminal
<i>Lippia graveolens</i> (hoja)	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Neurolaena lobata</i> (hoja)	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Petiveria alliacea</i> (hoja)	Positivo (I) ¹	Positivo (E) ²	Negativo
<i>Petiveria alliacea</i> (raíz)	Positivo (I)	Positivo (E)	Negativo
<i>Rizophora mangle</i> (corteza)	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Solanum americanum</i> (hoja)	Positivo (I)	Positivo (E)	Negativo

¹(I) = actividad inhibitoria

²(E) = actividad estimulante

C. Determinación de la CI₅₀ (concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria)

A todos los extractos se les determinó la CI₅₀ ensayando diferentes concentraciones

Tabla No. 2
Determinación de la CI₅₀

Nombre científico	Vía Clásica	Vía alterna
<i>Lippia graveolens</i> (hoja)	148 µg/ml	17 µg/ml
<i>Neurolaena lobata</i> (hoja)	40 µg/ml	42 µg/ml
<i>Petiveria alliacea</i> (hoja)	5 µg/ml	7 µg/ml
<i>Petiveria alliacea</i> (raíz)	14 µg/ml	6 µg/ml
<i>Rizophora mangle</i> (corteza)	31 µg/ml	111 µg/ml
<i>Solanum americanum</i> (hoja)	8 µg/ml	14 µg/ml

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Uno de los objetivos planteados del estudio fue el de estandarizar las técnicas de ensayos hemolíticos para determinar la actividad inmunomoduladora sobre el sistema de complemento. Por la falta de centrifuga de microplacas se hizo solamente una adaptación del método original que consistió en trabajar en cantidades semimicro en tubos eppendorf, que si pueden centrifugarse, lo cual no afectó los resultados. Se trabajó con concentraciones menores a las de 1 mg/ml con el objeto de eliminar la interferencia de los pigmentos propios de los extractos y se procedió a realizar diluciones seriadas iniciándose a concentraciones de 250 $\mu\text{g/ml}$ terminando a la concentración de 3.90 $\mu\text{g/ml}$ para la vía clásica y ruta lítica. En el ensayo de la vía alterna se inició a una concentración de 166 $\mu\text{g/ml}$ y se terminó con una concentración de 0.68 $\mu\text{g/ml}$.

Para realizar el presente estudio se utilizaron los extractos etanólicos de hoja de *Lippia graveolens*, hoja de *Neurolaena lobata*, hoja y raíz de *Petiveria alliacea*, corteza de *Rhizophora mangle* y hoja de *Solanum americanum*.

Las gráficas No. 1 a No.6 muestran resultados de la actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema de complemento, se observa que todos los extractos incluidos en el estudio presentaron actividad anticomplementaria o inhibidora sobre la vía clásica, también se observa que existe una buena relación Dosis-Efecto. De acuerdo a la tabla No.1 y No.2 los extractos con resultados positivos son hoja y raíz de *P. alliacea* y hoja de *S. americanum*, que bloquearon la activación de la vía clásica lo cual puede deberse a muchas causas, las principales: la producción de interferencia con los componentes C1, C2, C3, C4 ó con la IgG; la quelación de los cationes divalentes Ca^{+2} ó Mg^{+2} evitándose de esta forma la activación del sistema del complemento; otra causa puede ser la estimulación de sustancias reguladoras o inhibidoras de la activación de la vía clásica del sistema del complemento. También hay que tomar en cuenta que los lipopolisacáridos presentes en las membranas de las bacterias Gram negativo tienden a bloquear la activación de la vía clásica del sistema del complemento (3, 41).

Estos resultados demuestran un apoyo al uso popular y un beneficio al ser humano, ya que la planta de *P. alliacea* tiene reputación de poseer propiedades antiinflamatorias.

El sistema del complemento tiene una gran influencia sobre la inflamación, por lo que es necesario corroborar con estudios *in vivo*, teniendo presente que aunque todos los ensayos que existen para medir la actividad del complemento son cuantitativos, cada ensayo tiene sus limitaciones en predecir su capacidad para las condiciones *in vivo*.

De las gráficas No. 7 a la No. 12 muestran los resultados de la vía alterna, se puede observar que todos los extractos presentaron actividad estimulante en ésta vía, a excepción de *R. mangle* que presentó actividad inhibitoria, también se aprecia que existe una relación Dosis-Efecto. Según la tabla No.1 y No.2 los extractos que tienen resultado positivo son hoja y raíz de *P. alliacea*, hojas de *S. americanum*. Se sabe que la activación de la vía alterna es tan susceptible que a bajas concentraciones de contaminantes se puede producir la activación, por lo que los resultados pueden ser inespecíficos. Existe una gran variedad de contaminantes ambientales y propios del hábitat de la planta que pueden haber sido extraídos fácilmente con el disolvente utilizado (etanol), por ejemplo restos de paredes de hongos, componentes presentes en las membranas celulares de bacterias, etc. Por lo anterior es necesario realizar determinaciones de la concentración de lipopolisacáridos y proteínas para descartar posibles contaminaciones (41).

Según las gráficas No. 13 a la No. 18 muestran que ninguno de los extractos de planta incluidos en este estudio mostró actividad en la ruta terminal.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los cuales muestran que de los extractos estudiados mas de uno presentó actividad inmunomoduladora la hipótesis planeada es aceptada.

Se sabe que existen extractos de plantas que producen hemólisis de eritrocitos a diferentes concentraciones y diferente tiempo de contacto por lo que es necesario investigar sobre la cinética de hemólisis de los extractos estudiados y de esta forma determinar otros mecanismos de acción que éstas poseen (66).

X. CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos de hojas de *P. alliacea* ($CI_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$), raíz de *P. alliacea* ($CI_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$) y hojas de *S. americanum* ($CI_{50} = 8 \mu\text{g/ml}$), presentaron actividad supresora en la vía clásica del sistema de complemento.
2. Los extractos etanólicos de hojas de *P. alliacea* ($CI_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$), raíz de *P. alliacea* ($CI_{50} = 6 \mu\text{g/ml}$), y hojas de *S. americanum* ($CI_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$) presentaron activación en la vía alterna del sistema de complemento.
3. Ninguno de los extractos presentó actividad inmunomoduladora en la ruta terminal del sistema de complemento.

XI. RECOMENDACIONES

1. Determinar la presencia de lipopolisacáridos y proteínas a los extractos estudiados
2. Seguir las estandarizaciones del método con respecto a la vía alterna y eliminar los posibles contaminantes desde la recolección hasta la extracción de las muestras.
3. Determinar las fracciones que contienen el componente activo de los extractos de plantas que presentaron actividad inmunomoduladora, caracterizar la estructura molecular y determinar el mecanismo de acción.
4. Corroborar los resultados que se obtuvieron en esta investigación con estudios *in vivo* y con bioensayos que determinen fracciones del complemento.
5. Realizar estudios *in vitro* que determinen la cinética de hemólisis en eritrocitos humanos de los extractos de plantas estudiados
6. Ampliar los estudios con otras plantas inmunomoduladoras utilizadas en la medicina popular como por ejemplo las plantas antiinflamatorias.

XII. REFERENCIAS

1. Roit I, Brostoff J, Male D. Immunology. Estados Unidos de América: Editorial Churchill Livingstone, 1985. 251p.
2. Chatterjee SS, Schwabe W. Constituyentes activos y estandarización de los extractos medicinales derivados de plantas con actividad sobre el SNC. *Mundo Médico*. 1998;15:7-9.
3. Colegat S, Molyneux R. Bioactive Natural Products. Estados Unidos de América: Editorial CRC Press, Inc., 1993. 528p.
4. Cáceres A. *et al.* Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991; 34:173-187.
5. Meza N. Efecto de cinco extractos de plantas nativas usadas como adaptógenos en la actividad linfoproliferativa *in vitro*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 42p. (pp. 30).
6. Horsten SFA. Cyclic peptides in the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). Utrecht: Editorial Elinkwijk B.V., 1995. 239p.
7. Kroes BH., Nimba Arishta Impact of the Preparation Process on Chemical Parameters and Immunomodulatory Activity. Utrecht: Editorial Elinkwijk B.V., 1990. 159p.
8. Margani R. La Respuesta Inmune. *Revista de Divulgación y tecnología de la Asociación Ciencia hoy*. 1997; 6(36):6-11.
9. Bach JF. Inmunología. Primera Edición. México: Editorial Limusa, 1984. 908p.

29. Wagner H. Proksch A. Economic And Medical Plant Research. Vol. No. 1. London: Editorial Academic Press Inc., 1985.
30. Hadden J., Szentivcinyi. Immunopharmacology. Vol 1. Estados Unidos de América: Editorial Plenum Press., 1990. 418p.
31. Dean J., Luster H., Munson A. Agent Immunomodulatory, Immunotoxicology and Immunopharmacology. Estados Unidos de América: Editorial Raven Press New York, 1985.
32. Bertram G. Katzun G. Farmacología Básica y Clínica. 2da. Ed. México: Editorial Manual Moderno S.A. de C.V. 1986.
33. Cañigueral S. y Vila R. Fitoterapia: Concepto y Limites, Fuentes de información. Disponible en: www.fitoterapia.net.
34. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Plantas medicinales en la Farmacia. Disponible en www.cof.es.
35. Abraham A. Fitoterapia. Argentina. Disponible en www.belgranocit.com.
36. Geosistemas Ismer S.L. La Fitoterapia. Disponible en www.masajeyterapia.com.
37. Portal argentino sobre Homeopatía unicista y terapias alternativas. Fitoterapia. disponible en www.aurasalud.com.
38. Alonso J. Y Golberg H. Fitoterapia. Disponible en www.sinectis.com.ar.
39. Golberg H. Adaptogenos. Disponible en www.holistica2000.com.

40. Villatoro EM. *Etnomedicina en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria 1984. 316 p. (pp. 40-43).
41. Simons JM. *et al.* Immunomodulatory Compounds from *Picrorhiza kurroa* isolation and characterization of two anti-complementary polymeric fractions from an aqueous root extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 1989;26:169-182.
42. Kosasi S. *et al.* Inhibitory activity of *Jatropha multifida* latex on classical complement pathway activity in human serum mediated by a calcium-binding proanthocyanidin. *Journal of Ethnopharmacology*. 1989;27:81-89.
43. Thabrew M. *et al.* Immunomodulatory activity of three Sri-Lankan medicinal plants used in hepatic disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991;33:63-66.
44. Hart L. *et al.* Two functionally and chemically distinct immunomodulatory compounds in the gel of *Aloe vera*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988;23:61-71.
45. Stefanova Z. *et al.* Effect of a total extract from *Fraxinus ornus* stem bark and esculin on zymosan-and carrageenan-induced paw oedema in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995;46:101-106.
46. Van Der Nar JM. Immunomodulatory activity of an aqueous extract of *Azadirachta indica* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*. 1987;19:125-135.
47. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal Infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and trypanosomes American of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 62:195-202.

48. Cáceres A, *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemala plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 62:107-115.
49. Weniger B, Robineau L. Elementos de una Farmacopea caribeña (seminario) Tramil 3. Cuba. Universidad de Cuba, 1988. 250p.
50. Dabroy L. Confirmación de la actividad antibacteriana de algunas especies de Género *Lippia* contra bacterias que causan infección respiratoria. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 45p.
51. Mendoza J. Confirmación de la actividad antimicrobiana de tres especies del genero *Lippia* . Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 46p.
52. Berger I. *et al* y col. Antiprotozoal Activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research*. 2001; 15:327-330.
53. Yapur A. Efecto de infusiones de *Jacaranda mimosifolia*, *Neurolaena lobata* y *Solanum hartwegii* sobre curvas de parasitemia de *Trypanosoma cruzi* en ratones.. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 51 p.
54. Meza K. Actividad antimicótica de siete plantas nativas de uso medicinal del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 53p.
55. Alonso JR. Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas. Argentina: Isis Ediciones SRL. 1998. 967p.

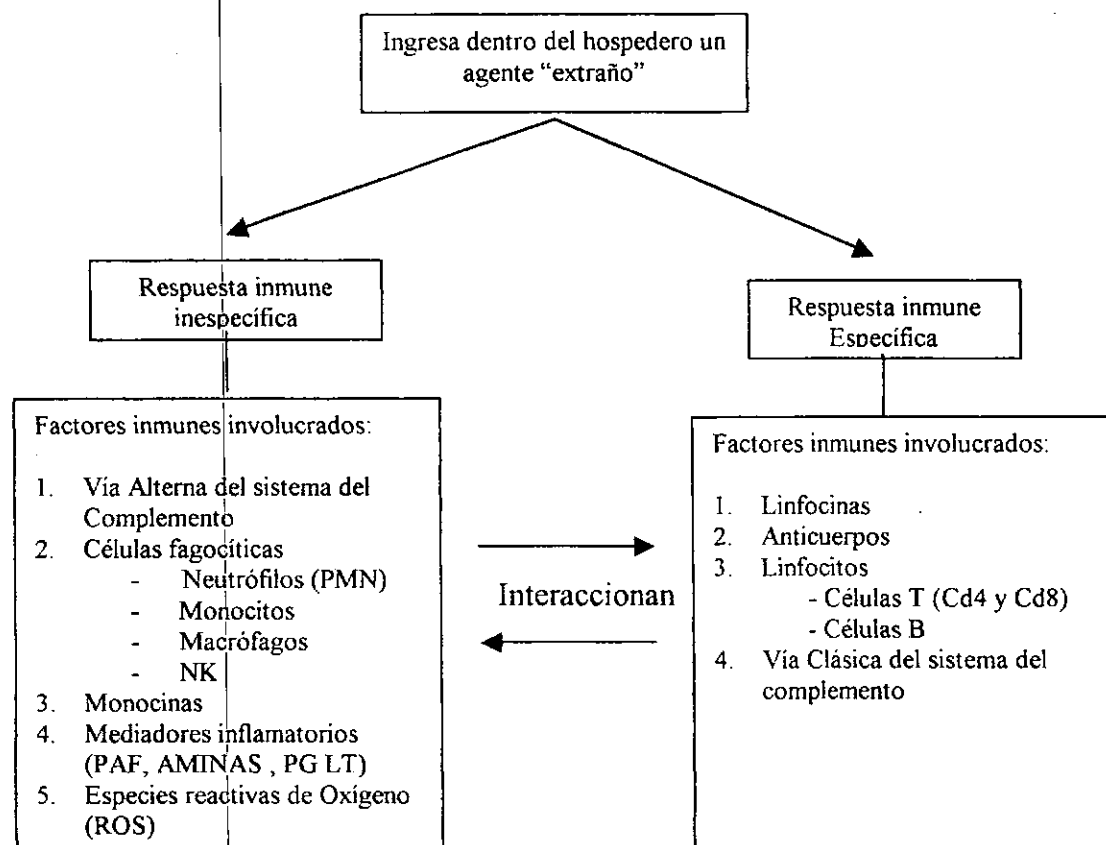
56. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimicrobial activity of 44 plant extract. *Journal of ethnopharmacology*. 1991; 20: 263-276.
57. Cáceres A. *et al.* Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of ethnopharmacology* 1987; 20:223-237.
58. Lawrence A *et al.* Immunomodulatory Activities of *Petiveria alliacea*. *Phytotherapy Research*. 1997; 11: 251-253.
59. Herrera J. Y Cevallos E. Manglares: ecosistemas valiosos. México. Disponible en WWW.conabio.gob.mx/biodiverita/mangle.htm.
60. Jauregui E. Inhibición *in vitro* de *Candida albicans* por diez plantas usadas en el tratamiento de infecciones dermatomucosas. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. 50p.
61. Juárez X. Estudio integral de la Actividad Antimicrobiana de *Gliricidia sepium* y *R. mangle*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992. 67 p.
62. Arriola L. Inhibición de levaduras patógenas al hombre por *Rhizophora mangle* y *Smilax lundellii*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1993. 50p.
63. Cáceres A. Plantas de uso medicinal de Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria 1996. 402 p. (pp. 31-312).

64. Girón M. Actividad antimicótica de plantas de las familias Papaveracea y Solanacea popularmente usadas en el tratamiento de afecciones de la piel. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1989. 59p.
65. Médez A. Evaluación de la actividad anti *Candida albicans in vitro* de diez plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991.
66. Sharma P. *Et al.* In vitro of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *Phytotherapy Research*. 2001; 74: 239-243.
67. The Cleveland Clinic Foundation. Understanding The System Complement. Disponible en www.ccf.org.

X. ANEXOS

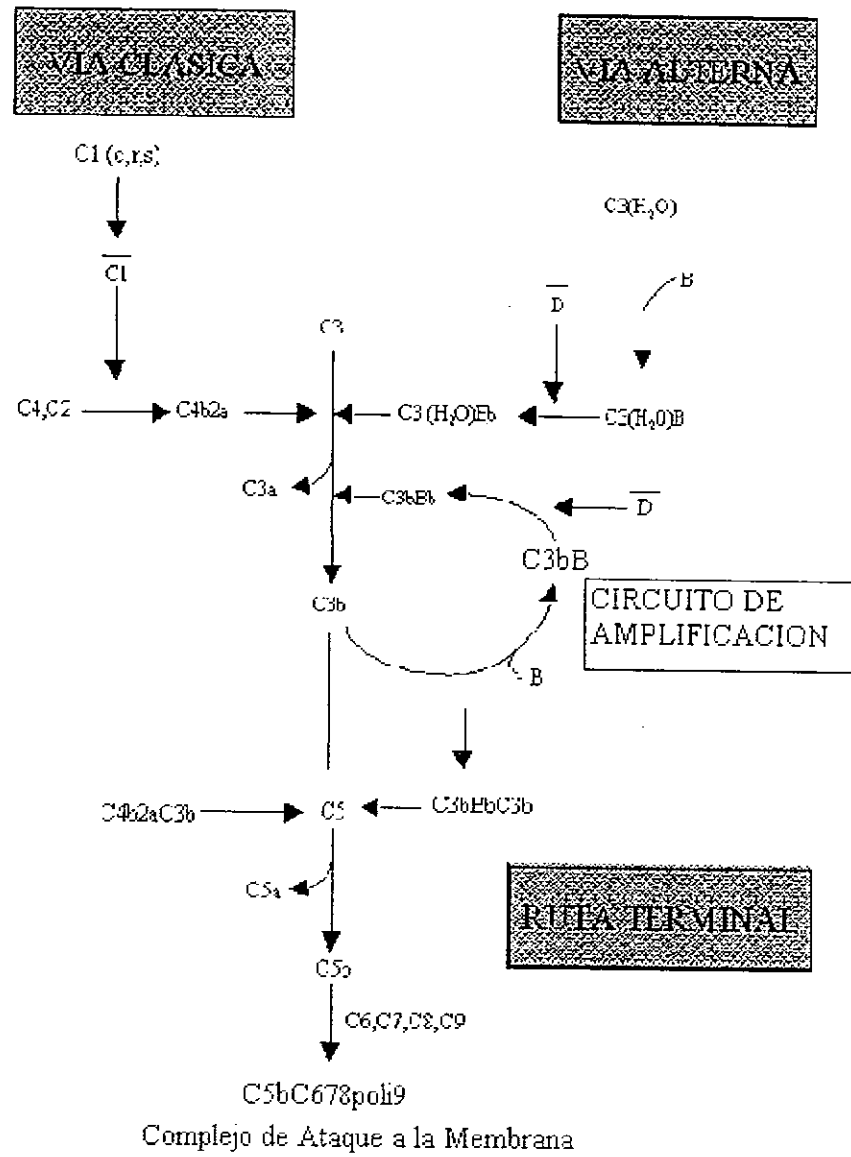
ANEXO 1

La respuesta inmune



Tomado de: Van den Berg AJJ. Final Report on Sri Lankan Medical Plants.
Netherlands: Elinkwijk B.V. 1992. 103p.(p.14)

ANEXO 2
EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

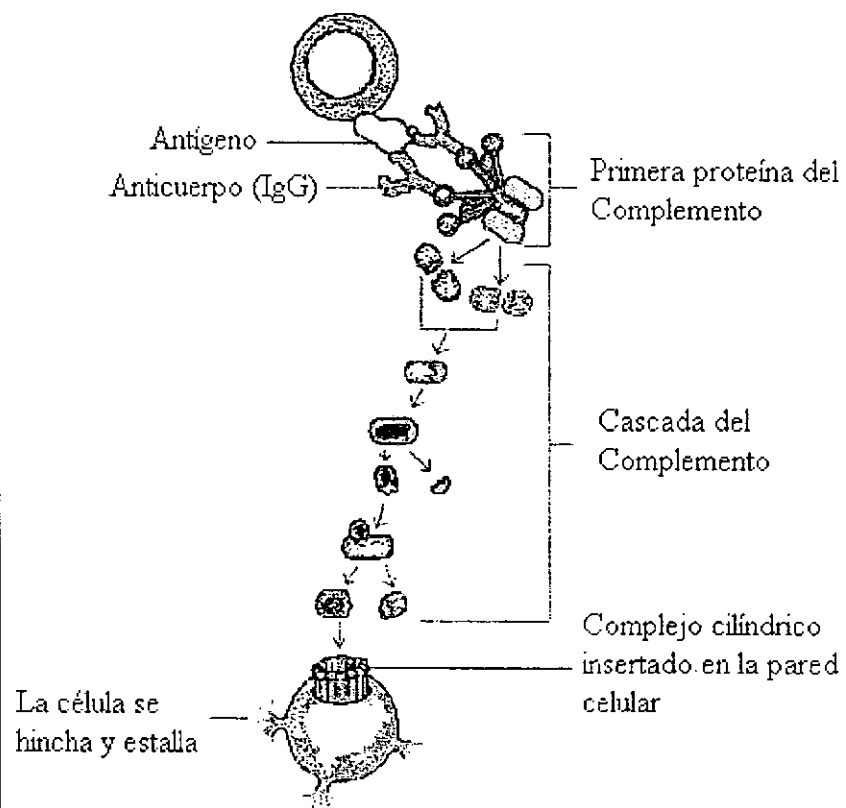


Tomado de: Horsten AJ. Cyclic Peptides in the genus *Jatropha* (euphorbiaceae)

Netherlands: elinkwijk B.V. 1995. 239p. (p.37)

ANEXO 3

LA VÍA CLÁSICA DEL COMPLEMENTO



Tomado de: Understanding the system complement. disponible en www.ccf.org

ANEXO 4

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

CARTA DE CONSENTIMIENTO**NOMBRE DE LA INVESTIGACIÓN:**

Tamizaje de la actividad inmunomoduladora del sistema del complemento por extractos de cinco plantas medicinales usadas en el tratamiento de infecciones por protozoos intracelulares

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

Annabella Osorio Velásquez

INFORMACIÓN SOBRE LA INVESTIGACION

En la realización de esta investigación se necesitan de algunas proteínas que se encuentran presentes en la sangre, que en conjunto se les conoce con el nombre de complemento, se necesitan cinco donadores para realizar una mezcla de los sueros que se obtengan; con lo cual se obtiene una concentración normal de proteínas.

YO _____ con número de carné _____

Después de haber recibido la información arriba mencionada acepto donar 5 ml de sangre para esta investigación y participo voluntariamente, entiendo también que mi participación no implica ningún riesgo para mi salud por lo que firmo este documento; exonerando de cualquier responsabilidad a la Unidad de Salud así como a la Jefatura de la División del Bienestar Estudiantil Universitario de la USAC.

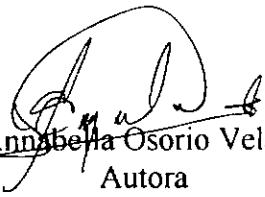
Guatemala _____ de _____ de 2002

NOMBRE DEL PARTICIPANTE

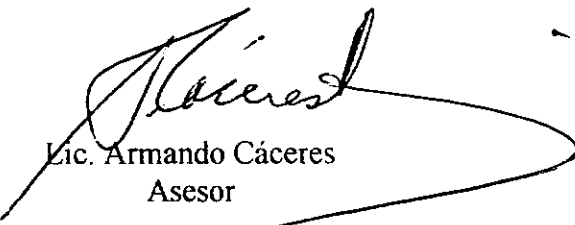
FIRMA DEL PARTICIPANTE

NOMBRE DEL INVESTIGADOR

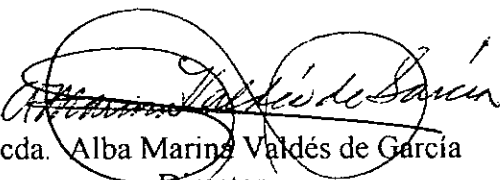
FIRMA DEL INVESTIGADOR

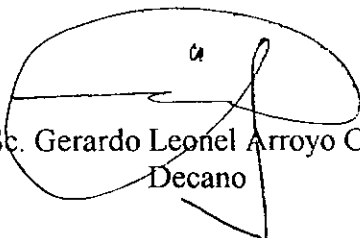

Br. Annabella Osorio Velásquez
Autora


Licda. Ana Margarita Paz de Ramírez
Asesora


Lic. Armando Cáceres
Asesor


Lic. Martín Gil Carrillo
Revisor


Licda. Alba Marina Valdés de García
Directora


M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano