

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

**Actividad Inmunomoduladora de rizomas y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y  
*Phlebodium decumanun***

**Informe Final**

**Presentado por**

**Egly Maribel Alvarez Chó**

**Para optar al Título de**

**Químico Biólogo**

**Guatemala Marzo de 2006**

**INDICE**

	<b>Página</b>
<b>I. Resumen</b>	03
<b>II. Introducción</b>	05
<b>III. Antecedentes</b>	06
A. Sistema Inmune	06
B. Respuesta Inmune	07
C. Linfocitos	07
D. Sistema de Complemento	09
E. Inmunomodulación	14
F. Medicina Tradicional	15
<b>IV. Justificación</b>	19
<b>V. Objetivos</b>	20
<b>VI. Hipótesis</b>	21
<b>VII. Materiales y Métodos</b>	22
A. Universo de Trabajo	22
B. Recursos	22
C. Procedimiento	24
D. Diseño Estadístico	29
E. Análisis de Datos	31
<b>VIII. Resultados</b>	33
<b>IX. Discusión de Resultados</b>	39
<b>X. Conclusiones</b>	43
<b>XI. Recomendaciones</b>	44
<b>XII. Referencias</b>	45
<b>XIII. Anexos</b>	49

## I. RESUMEN

El presente estudio evaluó la actividad inmunomoduladora de dos especies de *Phlebodium* conocida comúnmente como calahuala a la que se le han atribuido diversos usos medicinales. Estas son *P. pseudoaureum* procedente de San Jerónimo Baja Verapaz, Guatemala y *P. decumanum* de Yohoa, Honduras; de cada una de ellas se obtuvieron y sometieron a estudio los extractos etanólicos de frondas y rizomas.

Los bioensayos utilizados fueron, un ensayo linfoproliferativo y un ensayo hemolítico para la valoración del sistema de complemento. El ensayo linfoproliferativo se realizó utilizando dos metodologías, una manual consistente en un conteo directo de linfocitos y la otra utilizando un método colorimétrico con XTT, una sal de tetrazolio que es reducida a un producto coloreado y soluble, por la actividad enzimática mitocondrial presente en células vivas.

La evaluación sobre la actividad del Sistema de Complemento se efectuó mediante ensayos basados en la hemólisis de los eritrocitos por el Complejo de Ataque a Membrana (CAM) generado al activarse el sistema de complemento, los eritrocitos actúan como activadores y células blanco y tras esta activación se produce la lisis de eritrocitos liberándose hemoglobina, la cual es medida. Para la vía clásica se emplean eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero; en la vía alterna el ensayo es similar, dependiendo la lisis de eritrocitos de conejo.

Para el ensayo linfoproliferativo los extractos de frondas y rizomas de *P. pseudoaureum* fueron los que presentaron actividad, siendo esta de tipo inhibitorio mostrando ambos extractos una Concentración Efectiva Mínima (CEM) de 31.2 µg/mL con la metodología manual; y en el ensayo colorimétrico de 31.2 µg/mL para el extracto de frondas y de 15.7 µg/mL para el extracto de rizomas.

En la valoración de la vía clásica del sistema de complemento todos los extractos presentaron actividad inhibitoria del mismo, y se obtuvo la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) que es la concentración de extracto capaz de inhibir el 50% de hemólisis, presentando el extracto de frondas de *P. decumanun* una CI<sub>50</sub>= 2.37 µg/mL, el rizoma de *P.*

*decumanum*  $CI_{50}= 8.53 \mu\text{g/mL}$ , las frondas de *P. pseudoaureum*  $CI_{50}= 13.76 \mu\text{g/mL}$  y los rizomas de *P. pseudoaureum*  $CI_{50}= 13.84 \mu\text{g/mL}$ .

En la vía alterna, el extracto de rizomas de *P. decumanum* fue el único que no presentó actividad sobre esta vía, y los tres restantes también presentaron actividad inhibitoria, con una  $CI_{50}= 3.43 \mu\text{g/mL}$  para el extracto de frondas de *P. pseudoaureum*,  $CI_{50}= 7.47 \mu\text{g/mL}$  para rizoma de *P. pseudoaureum* y  $CI_{50}= 12.43 \mu\text{g/mL}$  para frondas de *P. decumanum*.

Al analizar estos resultados se concluyó que los extractos evaluados son de interés por su efecto inmunosupresor sobre el sistema de complemento y la actividad linfocítica, aunque en este último caso sólo *P. pseudoaureum* mostrara actividad, sugiriendo así su utilización posterior en el tratamiento de diversas enfermedades que involucren la monitorización de los niveles del sistema de complemento, especialmente los de la vía clásica por ser utilizados como indicador de actividad inflamatoria, u otras patologías en las que es necesario disminuir la excesiva estimulación del sistema inmune.

## II. INTRODUCCIÓN

El hombre posee el privilegio de protegerse del impacto de agentes patógenos que puedan alterar el equilibrio entre salud y enfermedad, puesto que poseen mecanismos de defensa que aseguran cierta integridad; al fallar estos mecanismos se producen las infecciones.

El sistema inmune que es el encargado de mantener la integridad del organismo, posee funciones como especificidad, memoria y distinción entre lo propio y lo extraño. Su complejidad es una razón que impide desarrollar sistemas *in vitro* que demuestren todo lo que ocurre *in vivo*. Aunado al descubrimiento de diversas enfermedades autoinmunes, es por tanto necesaria la búsqueda de medicamentos capaces de inhibir o estimular la respuesta inmune, según sea el caso.

La fitoterapia ofrece una alternativa para este tipo de afecciones, teniendo en cuenta que las plantas usadas por su actividad antibacteriana, antiviral, antitumoral o antifúngica, pueden ser candidatos para ser evaluados como agentes inmunomoduladores.

Instituciones como el laboratorio Farmaya y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC interesadas en esto, han desarrollado diversos estudios, para dilucidar las diferentes bioactividades y posibles efectos secundarios que poseen las plantas.

En el presente estudio, fue evaluada la actividad inmunomoduladora de calahuala, a través de dos bioensayos: proliferación de linfocitos y ensayo hemolítico para la valoración del sistema de complemento; ya que estos se encuentran entre los bioensayos más utilizados para tal fin. Los datos aportados permitirán promover su uso como una alternativa en la terapéutica de desórdenes inmunitarios, y estudios posteriores para dilucidar todos sus compuestos activos.

### III. ANTECEDENTES

#### A. SISTEMA INMUNE

El término “inmunidad” proviene del vocablo latino *immun* (*in* privativo, *munus*, carga; es decir privado de carga, privilegiado, seguro). Es la respuesta de un hospedero a un agente agresor y las consecuencias de ella derivadas. Así pues, el hombre y los animales son privilegiados ya que normalmente no sufren el impacto de los agentes patógenos y de todos aquellos agresores que los rodean, ya que poseen los mecanismos de defensa que les aseguran cierta integridad y al haber fallas de esos mecanismos se producen infecciones o agresiones (1,2).

El sistema inmune es el encargado de proteger y mantener la integridad del organismo ante la agresión de agentes patógenos, sus funciones básicas son: distinción entre lo propio y lo extraño, especificidad y memoria (3,4).

Posee una complejidad, que compromete a diversos órganos y tejidos, como la sangre periférica, médula ósea, órganos linfáticos, linfocitos y células accesorias, siendo por tal razón imposible desarrollar un sistema *in vitro* que tome en cuenta la totalidad de la interacción que ocurre *in vivo* (5).

Consta de varias líneas de defensa principales: inmunidad innata (natural o inespecífica) que es una línea de defensa que permite controlar a la mayor parte de los agentes patógenos e inmunidad adquirida (adaptativa o específica) la cual suministra una respuesta específica frente a cada agente infeccioso.

La memoria inmunológica es específica, lo que tiende a evitar que el agente infeccioso provoque enfermedad en una segunda infección. Pero incluso antes de que actúe la inmunidad inespecífica, el organismo posee una serie de barreras naturales que lo protegen de la infección de los agentes patógenos, así como una protección biológica por medio de la microbiota natural que posee (6).

## **B. RESPUESTA INMUNE**

La reacción inmunitaria constituye la forma de respuesta específica que un organismo tiene para defender su integridad frente a sustancias de diversos orígenes, las cuales pueden o no formar parte de otros organismos vivos, se caracteriza por su especificidad para reconocer mínimas diferencias entre los antígenos, su gran capacidad para recordar o memorizar contactos previos y la utilización de un sistema específico: el inmunitario, constituido básicamente por linfocitos, macrófagos y otras células cooperadoras (7).

La respuesta inmunológica se efectúa en tres etapas:

1. La primera, comprendida por la llegada del antígeno y su contacto con los receptores específicos ubicados en la membrana del linfocito. En esta etapa los macrófagos efectúan su rol fagocitario y degradatorio, a efecto de presentar el antígeno a los linfocitos para el reconocimiento antigénico.
2. La segunda etapa muestra los mecanismos de cooperación celular y las interacciones entre antígeno, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, inmunoglobulinas, etc. Aquí los linfocitos se transforman frente a un antígeno específico para generar linfocitos con memoria y linfocitos efectores.
3. La tercer etapa se fundamenta por la acción destructora de células efectoras sobre el antígeno (2,6-7).

## **C. LINFOCITOS**

Los linfocitos son la primera línea celular implicada en la respuesta inmune, es decir son los principales guerreros de la respuesta inmune (1,8-9). Los linfocitos T y B son los responsables de la respuesta inmune específica, se producen en los órganos linfoides primarios a razón de 1000 millones al día, y de allí migran a órganos linfoides secundarios y a espacios tisulares. En el adulto existe un billón de linfocitos, equivalentes a un 2% del peso corporal. Suponen del 20 al 40% de los leucocitos totales. Existen tres poblaciones de linfocitos funcionalmente distintas, caracterizada cada una por un juego de marcadores, pero son difíciles de reconocer morfológicamente entre sí:

1. células T

2. células B
3. células NK

Los **linfocitos T y B vírgenes** (no cebados) son pequeños, con poco citoplasma, que forma un estrecho anillo alrededor del núcleo. Poseen cromosomas condensados, con abundante heterocromatina; albergan pocas mitocondrias, y casi nada de retículo endoplásmico, ni de complejo de Golgi. En ausencia del Ag específico, tienen vida corta (de unos días a unas pocas semanas), y fácilmente sufren muerte celular programada; al entrar en contacto con el Ag a partir de sus receptores específicos, sale de la fase  $G_0$  y entran en el ciclo celular ( $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ ). En la fase  $G_2$  corresponden a **linfoblastos**: aumentan su tamaño, algo la eucromatina, aparece un nucleolo patente y aumenta la proporción del citoplasma. Estos linfoblastos proliferan y finalmente se diferencian en dos sub poblaciones: **células efectoras**, de vida corta, con RER bien desarrollado en capas concéntricas y **células de memoria**, que están en  $G_0$ , con vida larga (algunas duran toda la vida del individuo) (1, 2,6).

### 1. Linfocitos B

Se diferencian en la médula ósea, constituyen del 5 al 15% de los linfocitos circulantes. Reconocen al antígeno en forma soluble, por medio de sus inmunoglobulinas de membrana (Ig), que forman parte del complejo receptor de las células B (BCR). En cada linfocito hay unas 150.000 moléculas de Ig (de las clases M y D), que han sido sintetizadas por él y poseen la misma especificidad antigénica (6,10).

### 2. Linfocitos T

Durante la infancia, se diferencian en el timo, pero al llegar la adolescencia, el timo involuciona, y entonces la diferenciación ocurre sobre todo en la piel y mucosa intestinal. Poseen un receptor de membrana (TCR) asociado no covalentemente al llamado complejo CD3, lo que conjuntamente se denomina complejo receptor de las células T. Aunque es diferente estructuralmente a las Ig, posee zonas homólogas. Una diferencia importante del modo de reconocimiento antigénico del TCR respecto del BCR es que aquél sólo interacciona con el Ag dispuesto en la superficie de células del propio organismo.



Existen dos tipos de TCR, que definen dos poblaciones diferentes de linfocitos T: TCR2 y TCR1. La mayoría (85%) de las células T poseen el TCR2, y a su vez se pueden dividir en dos tipos: las TCR2 CD4<sup>+</sup> funcionan como células cooperadoras (T<sub>H</sub>): reconocen el Ag expuesto por el MHC-II propio de células presentadoras de Ag (APC), y al hacerlo, se activan y expanden clonalmente, secretando citoquinas, las que a su vez activan otras células (B, T, etc.).

Y las TCR2 CD8<sup>+</sup> generalmente funcionan como células T citotóxicas (T<sub>c</sub>) estas reconocen el Ag expuesto en moléculas MHC-I de células propias infectadas con virus o células cancerosas, lo cual, junto con las señales adecuadas de citoquinas, provoca la activación y proliferación clonal, con diferenciación a linfocitos T citolíticos (CTL), que matan extracelularmente a las células propias enfermas; los linfocitos T supresores (T<sub>s</sub>), tienen la función de suprimir la actividad de las células T<sub>H</sub> y B (6).

#### **D. SISTEMA DE COMPLEMENTO**

Esta compuesto por aproximadamente treinta proteínas presentes en el plasma y membranas celulares, que interactúan entre sí, en forma regulada formando una cascada enzimática, amplificando la respuesta humoral, su activación y fijación a microorganismos constituye un importantísimo mecanismo efector del sistema inmune, facilitando la eliminación del antígeno y generando una respuesta inflamatoria. La mayoría de los componentes del complemento se sintetizan en el hígado (excepto C1q, D y P). El C1q lo sintetizan células epiteliales y el factor D el adipocito. Las consecuencias de la activación y fijación del complemento incluyen: lisis del microorganismo o célula diana, opsonización, con la consiguiente mejora de la fagocitosis y destrucción, quimiotaxis, amplificación de la respuesta humoral específica y eliminación de los inmunocomplejos (6).

Este sistema está compuesto por cuatro unidades funcionales: la vía clásica, la vía alterna, la unidad de amplificación y la ruta terminal. Las primeras dos son las principales vías de activación, y funcionan por interacción de proteínas, procediendo por medio de una activación secuencial y ensamblaje de una serie de componentes, que conducen a la formación de complejos enzimáticos capaces de unirse y romper el componente clave C3;

comparten la última fase consistente en el ensamblaje, sobre la superficie del microorganismo, del denominado complejo de ataque a la membrana (2,6).

## 1. Nomenclatura

En la ruta clásica (incluyendo el sistema de ataque a la membrana), los componentes son (según su orden de actuación): C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9. Muchos de ellos son proenzimas (zimógenos) que requieren su rotura proteolítica para convertirse en enzimas activas. Las formas activas se distinguen de las inactivas por una barra horizontal superior encima del componente implicado y las formas inactivas se denominan colocando una "i" delante del componente respectivo. Cuando un componente se escinde proteolíticamente en dos, el fragmento de mayor tamaño se designa colocando tras la denominación del componente original una "b"; el fragmento de menor tamaño se designa con una "a" tras el nombre del elemento original. Ej.: la ruptura del C3 genera un fragmento grande, denominado C3b y un fragmento pequeño, el C3a; existe una excepción: el fragmento grande derivado de C2 se llama C2a, y el fragmento pequeño, C2b. En la ruta alternativa, los componentes se suelen llamar factores, y en muchos casos su nomenclatura es a base de una letra mayúscula: factor B, factor D, factor H, factor P (6)

## 2. Activación del complemento

En la activación del complemento, el punto central es la formación de una C3-convertasa, capaz de convertir catalíticamente el componente C3 en C3b y C3a.

- en la ruta clásica (y de las lectinas) la C3-convertasa es el complejo activo C4b2a;
- en la ruta alternativa, la C3-convertasa es el complejo activo C3bBb.

Ambas producen grandes cantidades de C3b, que se unen a la superficie del microorganismo, lo cual a su vez constituye un "foco" para seguir produciendo e insertando más moléculas de C3b (cascada de amplificación).

Por otro lado, cuando a cada una de las C3-convertasas anteriores se le adjunta una molécula de C3b, se convierte en la correspondiente C5-convertasa, capaz de catalizar el primer paso de la cascada que conducirá al ensamblaje del complejo de ataque a la membrana.

### **a. Activación de la vía clásica**

Comienza por la unión del complejo C1 a complejos antígeno-anticuerpo (inmunocomplejos). El C1 es un complejo formado por 5 proteínas y estabilizado por iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Consta de una molécula de C1q, dos de C1r y otras dos de C1s. Uno de los aspectos fundamentales de C1q es su capacidad de unirse a Fc de inmunoglobulinas, siempre que éstas ya estén formando parte de inmunocomplejos. La unión de varios dominios globulares de un mismo complejo C1 parece que induce en éste un cambio conformacional, que supone la activación de una molécula de C1r por autocatálisis; a su vez, esta C1r activada activa a la otra molécula de C1r. Las dos moléculas activas de C1r ejercen la hidrólisis de las dos C1s, con lo que éstas quedan activadas: las dos C1s activas poseen actividad de serín-esterasas. El siguiente paso es la ruptura catalítica de C4 por la serín-proteasa de C1s dentro del complejo activo C1q r<sub>2</sub> s<sub>2</sub>, liberándose el fragmento pequeño C4a (que queda en disolución) y el fragmento C4b\*. Este C4b\* es un intermediario inestable que enseguida es atacado nucleofílicamente; el C4b unido covalentemente a la superficie microbiana va a servir ahora como sitio de unión del componente C2, formándose así complejos C4b C2 en la membrana del patógeno, cerca de donde quedó fijado el complejo C1. El C2 de los complejos C4b2 es a su vez otro sustrato del cercano C1s, cuya acción genera el fragmento pequeño C2b, que queda en solución y el C2a. Quedando en la membrana un complejo ya activado, el C4b2a, que es la C-3 convertasa de esta ruta clásica, la cual convierte catalíticamente (por hidrólisis) muchas moléculas de C3 a C3a (difusibles) y C3b, que se van anclando a la membrana del microorganismo. Este C3b unido a membrana actúa a su vez como núcleo "focalizador" para que continúe la activación del complemento siendo esta la forma en que se van fijando grandes cantidades de C3b a la superficie del microorganismo. (6).

### **b. Activación de la vía alterna**

Se activa por unión de proteínas del complemento a la superficie de los microorganismos, antes de que entre en acción la ruta clásica y no necesita anticuerpos para su activación (11). El C3b unido a la membrana del microorganismo generado de forma espontánea a niveles bajos o por la vía clásica, se une al factor B. Resultando un complejo C3bB que es a su vez sustrato del factor D, que es otra serín-proteasa, la cual rompe el B

unido, generando el complejo activo C3bBb, este complejo es una C-3 convertasa (cuya actividad reside en Bb), se disocia rápidamente, puede estabilizarse por unión con la properdina (factor P del hospedador), formando ya el complejo estable C3bBbP, que es la C-3 convertasa unida a membrana, de la ruta alternativa. Dicha C-3 convertasa estable rompe numerosas moléculas de C3, cuyos respectivos fragmentos grandes C3b tienden a unirse cerca de la misma convertasa unida a membrana (2,6).

#### **c. Ruta terminal**

Consiste en la formación de una C5-convertasa, que rompe el C5 desencadenando el ensamblaje en la superficie del microorganismo del complejo de ataque a la membrana (CAM). Se inicia al enlazarse C5 y su posterior rotura por la convertasa de la vía clásica o alterna, dando los productos C5a y C5b. C5b se une a la membrana del microorganismo y se añaden después de forma ordenada y secuencial C6 para estabilizarse y este complejo formado se une a C7, que constituye la tercera proteína implicada en el ataque a la membrana. El complejo C5b67 interactúa con los lípidos de las membranas celulares, en ese lugar puede aceptar una molécula de C8 y luego 14 unidades del componente C9. Estos monómeros de C9 se ensamblan para dar una estructura poli-9, en forma de canal hueco que atraviesa la membrana de lado a lado. El conjunto C5b678poli-9 es lo que constituye el complejo de ataque a membrana, cuyo efecto principal es la producción de un desequilibrio osmótico que conduce a lisis (2,6).

#### **d. Mecanismos de control**

Este sistema está bien regulado por varias proteínas solubles, que se asocian a las membranas que inhiben la activación del complemento en múltiples pasos. Las principales funciones de la regulación son la limitación o detención de la activación del complemento como respuesta a estímulos fisiológicos y evitar la activación anormal sin la presencia de microorganismos y anticuerpos. Hay varios tipos de estrategias reguladoras, una de ellas es la labilidad en solución de algunos componentes que se inactivan por degradación rápida al alejarse del lugar de interacción con la célula diana; otra es un inhibidor de C1, llamado C1Inh, que inactiva C1r y C1s; pero el principal punto de control es evitar la formación de C3-convertasa en la superficie del hospedero, lo que se lleva a cabo por acción de proteínas

de control del complemento las cuales poseen uno o más copias de SCR (secuencia corta consenso); la proteína S o vitronectina del plasma se une a C5b67 cuando se difunde e induce una transición hidrófila, evitando así que se una a membranas cercanas y evitándose la lisis de células propias; la unión de la molécula de superficie CD59 con C8 del complejo C5b678 evita el ensamblaje del poli-C9 y del CAM (2,6).

### **3. Pruebas para la valoración del Sistema de Complemento**

Actualmente pueden medirse los nueve componentes principales de la vía clásica, algunos de la vía alterna e inhibidores; los análisis consisten en la cuantificación de la lisis total y análisis inmunoquímicos (inmunodifusión), estos últimos proveen concentraciones moleculares, pero no aportan datos referentes a la integridad de las diversas moléculas (2).

#### **a. Ensayos hemolíticos para la valoración de la actividad del sistema de complemento**

La inhibición de la actividad del Sistema de Complemento se determina mediante ensayos basados en la hemólisis de los eritrocitos por el CAM generado al activarse el sistema de complemento, los eritrocitos actúan como activadores y células blanco, tras esta activación se produce la lisis de eritrocitos liberándose hemoglobina, la cual es medida y utilizada como parámetro en la medida de la actividad del complemento. Para la vía clásica se emplea eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero y en la vía alterna el ensayo es similar, dependiendo de la lisis de eritrocitos de conejo, se debe inactivar la vía clásica utilizando ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) como agente quelante de calcio (necesario para su activación) (2).

#### **b. Prueba de Fijación del Complemento**

Se origina en la interacción antígeno y anticuerpo. Depende de dos etapas, la primera antígeno-anticuerpo, reacciona en presencia de una cantidad conocida del complemento, el cual se consume; la siguiente etapa consiste en medir la actividad hemolítica del complemento fijado, y de esta forma la cantidad de antígeno o anticuerpo de la mezcla inicial (2,11,12).

## **E. INMUNOMODULACIÓN**

La inmunomodulación puede definirse como la regulación global de las respuestas inmunitarias, incluyendo la inmunopotenciación (aumento de la regulación) y la inmunosupresión (disminución de la regulación). La inmunopotenciación es el incremento específico o inespecífico de la capacidad de respuesta inmunitaria, puede ser intrínseco o extrínseco, la potenciación global de la respuesta inmunitaria puede tener lugar por alteración de cualquiera de las etapas que intervienen en las reacciones inmunitarias del huésped. Un potenciador determinado puede aumentar un acontecimiento inmunitario: acortando el tiempo de latencia, aumentando el nivel o intensidad de la respuesta, alargando la duración de la respuesta, retrasando la terminación de la respuesta o desarrollando una nueva respuesta a un antígeno. Los compuestos capaces de aumentar la reactividad inmunitaria pueden ser: estimulantes inespecíficos o generales que aumentan la respuesta humoral y celular; y potenciadores específicos que aumentan un grupo limitado de respuestas inmunitarias. Mientras que inmunosupresión es el nombre que se da a la ausencia de respuesta específica y se refiere a la prevención o disminución de la expresión de respuestas inmunitarias (13).

Hablando de inmunomoduladores, se sabe que estos son compuestos que modifican la respuesta biológica y afectan de manera ya sea positiva o negativa la respuesta inmunitaria. Está examinándose un número creciente de inmunomoduladores para determinar el beneficio terapéutico que puedan aportar en diversos trastornos, incluyéndose el SIDA, entre dichos compuestos se tienen los derivados de Bacterias como el adyuvante de Freund, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG); compuestos derivados de microorganismos eucarióticos: hormonas tiroideas, citocinas, antagonistas de las citocinas, anticuerpos monoclonales, agentes bioquímicos; inmunomoduladores de origen vegetal (2).

## **F. MEDICINA TRADICIONAL**

En los últimos años la medicina tradicional ha tomado auge en el medio ladino y urbano, al punto que los llamados centros naturistas y la medicina natural hayan proliferado, y muchas personas prefieran elaborar sus medicinas caseras que recurrir a costosas prescripciones facultativas (14). Aun así, son pocos investigadores quienes

conocen la mayoría de plantas medicinales, aproximadamente unas 300 especies son utilizadas con fines terapéuticos, entre las más conocidas, y nativas que se encuentran de venta en los mercados son: pericón, calaguala, salvia santa, orégano, laurel, entre otras.

Algunas de las instituciones que se interesan por este tipo de terapia son: la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y la Facultad de Medicina de la USAC, el Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada (CEMAT) y el Laboratorio de productos Fitofarmacéuticos FARMAYA; éste último cuenta con una documentación amplia de plantas medicinales propias de nuestra región.

### **1. Fitoterapia**

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico. Una planta medicinal es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias activas (15).

La administración de plantas medicinales y sus derivados, se debe realizar cuidadosamente, garantizándose así el efecto terapéutico, se pueden utilizar extractos, tés, jarabes, tinturas, cremas, baños, inhalaciones, cataplasmas, aceites, etc. (16,17).

Entre los factores que han favorecido el uso de productos terapéuticos de origen natural nuevamente, están: el descubrimiento de efectos secundarios en fármacos sintéticos; nuevas formas de preparar y administrar las drogas vegetales y sus extractos; métodos de análisis que garantizan un mejor control de calidad; mayor conocimiento de las propiedades químicas, clínicas y farmacológicas de las plantas y sus productos derivados; el aumento de automedicación.

Es necesario tener cuidado en la administración de productos fitoterapéuticos, debe recordarse que lo natural no es sinónimo de inocuo (15).

Otros factores que favorecen a la fitoterapia como una herramienta terapéutica son: el comportamiento del mercado, en relación a materia prima y producto acabado; una creciente demanda de tratamientos poco agresivos y el aumento de interés por preparados fitoterapéuticos por la población; la tendencia hacia su uso racional, de acuerdo con sus posibilidades y límites; la disposición de medicamentos a base de plantas con calidad,

seguridad y eficacia garantizadas; la intensa actividad investigadora en el campo de las plantas medicinales en aspectos químicos, farmacológicos y clínicos (18).

## **2. Actividad inmunomoduladora de las plantas**

Los productos naturales y sus componentes pueden ser una fuente importante de moléculas con propiedades inmunomoduladoras. Sobre esta actividad se han publicado un elevado número de trabajos (18).

Algunas plantas que han demostrado tener actividad inmunomoduladora son *Allium sativum*, *Equinacea punpurea*, *Equinacea angustifolia*, *Uncaria tomentosa*, *Hydrastis canadensis*, *Aloe vera*, y *Pikorriza kurroa* (7).

La forma más rápida para detectar compuestos inmunoestimulantes *in vivo* es a través de experimentos con modelos de animales infectados o inmunodeprimidos, sin embargo para el estudio masivo de compuestos, los bioensayos *in vitro* son los más adecuados, su costo es bajo y pueden orientar sobre los posibles mecanismos de acción de las sustancias investigadas. La actividad inmunomoduladora *in vitro* se mide a diferentes niveles, desde los efectos sobre partes de órganos, preparación con células enteras como leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, linfocitos; hasta los efectos sobre sistemas enzimáticos y con técnicas de unión a receptores. Los criterios que se usan para seleccionar los bioensayos son la relevancia e importancia de las funciones o disfunciones efectoras inmunes, sea bajo condiciones normales o patológicas; es decir que deben estar orientados a la enfermedad (18). Algunos de los ensayos más usados para detectar la actividad inmunomoduladora de extractos son:

Fagocitosis granulocítica *in vitro*, ensayo de quimioluminiscencia; ensayo de quimiotaxis; fagocitosis *in vivo*, prueba de aclaramiento de carbón; ensayo de proliferación linfocítica; ensayo de citotoxicidad inmunoinducida; ensayo de actividad sobre el sistema de complemento *in vitro*; ensayo para la producción del factor de necrosis tumoral (TNF); prueba de la expresión del antígeno CD69 (18).

## **3. Plantas Medicinales en Guatemala**



Las condiciones fértiles de nuestra región, la diversidad de su flora, hacen que el empleo de las plantas medicinales con fines curativos, realizada desde tiempos remotos, sea retomada en la actualidad. Los estudios realizados por Cáceres y colaboradores a lo largo de estos años sobre las plantas más utilizadas en el país, la parte utilizada, forma de administrarse, sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y sus efectos tóxicos, confirman esta tendencia (19-22).

**a. *Phlebodium*:**

Pertenece a la familia *Polypodiaceae*, género *Polypodium*, algunas sinonimias son *Polypodium aureum*, *P.calahuala* L., *P. aereolatum* H&B, *P.decumanum* Willd., *P.leucotomos* Poir; se le conoce popularmente como calahuala, polipodio; es un helecho epifito que posee un rizoma rastrero y sinuoso, cubierto densamente con una pelusa dorada, café. Sus frondas son separadas, arqueadas o esparcidas sobre tallos brillantes, cafés, divididas en segmentos puntiagudos oblongos, existen ciertas diferencias entre *Phlebodium aureum* y *P.decumanum* Willd. (ver anexo A), la primera crece en bosques, tronco de árboles tierra y roca musgosa y a 1200-2200 msnm (ver anexo B), mientras que la segunda crece también en bosques y frecuentemente en pastos, praderas, tronco de árboles, en su mayor parte palma, crece a 500 msnm (16,17).

Se han realizados diversos estudios para demostrar las diversas bioactividades presentadas por este helecho y determinar sus principios activos; Horvath y colaboradores (1967) evaluaron los efectos metabólicos de calagualina una saponina antitumoral de *P.leucotomos*, encontrando que la administración de extracto puro en casos avanzados de neoplasias, produce un aumento significativo de sobrevivencia, sin detectarse efectos secundarios (23).

Tuominen y su equipo de trabajo en 1991 partiendo del conocimiento de su utilización en el tratamiento de psoriasis y otras enfermedades de tipo inmunológico analizaron su efecto luego de su administración a un modelo de trasplante de piel en ratas, concluyendo que el rechazo fue significativamente prolongado, sugiriendo que los resultados se deban a un efecto inmunosupresor (24) y en 1992 estudiaron el efecto de la adenosina, un principio activo de la Calaguala sobre el factor activador de plaquetas obteniendo que el efecto clínico en desórdenes inmunológicos puede ser explicado por la

inhibición presentada por dicho factor, directa o indirectamente y que dicho principio activo puede ser uno de los responsables de la reputación de las propiedades medicinales de ésta (25).

Cuellar *et al* (1997) estudiaron el efecto del extracto acuoso de *P. leucotomos* sobre la producción de un modelo de anticuerpos específicos en ratones BALB/c inmunizados con antígenos del tercer estadio larvario de *Anisakis simplex*, decreciendo el isotipo IgG1 en animales tratados antes de la inmunización, y mucho menor en comparación a los niveles de IgG2b que aparecieron tempranamente, al inicio, y fueron ligeramente más altos que en el grupo no tratado; después de la inmunización la reducción en los niveles de IgG1 no fue tan marcada como en la preinmunización y la subclase IgG2a mostró niveles ligeramente más altos que el grupo sin tratamiento (26).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente un componente de la medicina tradicional, es decir la medicación a base de plantas, ha cobrado mayor auge. Los estudios realizados tanto a nivel nacional como internacional sobre sus diversas actividades hacen que sean mejor conocidos sus efectos farmacológicos, y sus posibles efectos adversos.

Nuestro país cuenta con una amplia gama de plantas por cuyo efecto terapéutico se han utilizado desde tiempos remotos. Además por el costo que representa para la población, se ha observado su mayor utilización, favorecido también por el descubrimiento de graves efectos secundarios en fármacos sintéticos; nuevas formas de preparar y administrar las drogas vegetales y sus extractos, y los métodos de análisis que garantizan un mejor control de calidad.

Así mismo se ha observado, un marcado grado de desnutrición de la población en general, con lo que se aprecian estados de inmunodeficiencia leves o moderados; otro factor como el incremento en los casos de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), impulsan el deseo de buscar actividades biológicas en las plantas, una de ellas es la inmunomodulación.

El objeto de estudio de esta investigación era demostrar las propiedades inmunomoduladoras popularmente atribuidas a calahuala, a la cual se le dan diversos usos medicinales proponiendo evaluar el posible efecto inmunomodulador de sus frondas y rizomas. Algunos de los estudios realizados con ella se basaron en el uso popular del rizoma, lo cual no es considerado ecológico, por el poco aprovechamiento de la planta en sí; mientras que la utilización de frondas y su estudio farmacológico si lo es.

Obteniéndose con este tipo de estudio las bases para su posterior utilización en nuestro territorio como alternativa en la terapéutica de desórdenes inmunitarios, favoreciendo de esta forma a la población en general con la fitoterapia.

## V. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Evaluar el efecto inmunomodulador de extractos etanólicos de rizomas y frondas de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum*.

### B. ESPECÍFICOS

1. Demostrar a través de un ensayo hemolítico para la actividad de complemento el efecto inmunomodulador de rizomas y frondas de *P. pseudo.aureum* y *P. decumanum*.
2. Demostrar la presencia de actividad inmunomoduladora en frondas y rizomas de cuatro extractos etanólicos de la especie *Phlebodium* (calahuala) a través de un ensayo linfoproliferativo.
3. Comparar el efecto inmunomodulador de cada uno de los extractos a fin de establecer si existe diferencia homogénea, no homogénea, o ninguna diferencia entre ambas especies de *Phlebodium*.
4. Preparar una monografía con datos anteriores y los datos aportados en este estudio.

## **VI. HIPÓTESIS**

Todos los extractos etanólicos de las plantas a estudiar y que se utilizan para tratamiento de diversas afecciones, poseen efecto inmunomodulador.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO DE TRABAJO

Extractos etanólicos de plantas que poseen actividad inmunomoduladora

#### 1. Muestra

- a. Extractos etanólicos de rizoma y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanum*.
- b. Suero y sangre completa de donadores.

### B. RECURSOS

#### 1. Recursos humanos

##### a. Asesor

Licenciado Armando Cáceres

##### b. Tesista

Bachiller Egly Maribel Alvarez Chó.

#### 2. Recursos Institucionales

- a. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamento de Citohistología, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- b. Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya

#### 3. Recursos materiales

##### a. Equipo

Autoclave

Balanza analítica

Campana de Flujo laminar

Congelador  
Centrífuga  
Hemocitómetro de Neubauer  
Incubadora 37°C  
Lector de ELISA  
Refrigeradora

b. Materiales

Jarra con candela  
Placas estériles de 96 pozos, de fondo plano, con tapadera  
Placas estériles de 96 pozos, de fondo en U, con tapadera  
Pipetas de 10 uL, 50 uL, 100 uL, 200 uL y 1000 uL  
Pipetas pasteur  
Tubos de ensayo  
Tubos Eppendorf de 0.5 y 2.0 mL  
Tubos Vacutainer con EDTA de 5 mL  
Tubos de 50 mL

c. Reactivos

i. Ensayo linfoproliferativo

Histopaque  
Sal de tetrazolio (XTT)  
Lectinas de Con A y PHA  
Metosulfato de phenacina (PMS)  
Dimetil formamida  
Acido acético  
Cristal violeta  
Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute)  
RPMI-FBS (medio de cultivo más 10 % de suero fetal bovino)  
PBS (Amortiguador Salino de Fosfatos)

Gentamicina

EDTA (sal disódica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético)

ii. Ensayo hemolítico para la actividad de complemento

Mezcla de suero humano normal (MSH)

Mezcla de suero humano inactivado (30 min. a 56°C)

Solución salina

Agua destilada

Agua desmineralizada

Solución de Alsever

Eritrocitos de conejo y de carnero

Anticuerpos contra eritrocitos de carnero (AMBOCEPTOR)

Extractos etanólicos de dos plantas (para ambos ensayos)

Amortiguador salino de veronal concentrado 5 veces (VSB), como solución madre para preparar: VSB° (no contiene aditivos); VSB+2 (contiene 0.5 mM de Mg<sup>+2</sup> y 0.15 mM de Ca<sup>+2</sup>); EGTA-VG (contiene 2.5 mM de Mg<sup>+2</sup> y 8 mM de etilenglicol-bis(β-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA)).

### C. PROCEDIMIENTO

Para la realización de la fase experimental se efectuaron dos ensayos, el primero descrito a continuación, permitió cuantificar la linfoproliferación por medio de una medición espectrofotométrica directa en un lector ELISA, el número de células presente en cada pozo correlaciona con la capacidad de reducir la sal de tetrazolio (XTT) a un producto coloreado y soluble, dicha sal es reducida principalmente por la actividad enzimática mitocondrial presente básicamente en las células vivas (27).

El segundo ensayo basado en la hemólisis de los eritrocitos por el CAM generado tras la activación del sistema de complemento, siendo los eritrocitos activadores y células diana; la absorbancia de la hemoglobina liberada fué el parámetro utilizado en la medida de la actividad del complemento.



## 1. Ensayo linfoproliferativo

### a. Aislamiento y preparación de linfocitos

- i. Agregar sobre 5 mL de Histopaque un volumen de 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA, con una pipeta estéril.
- ii. Centrifugar en frío a 2400 rpm por 20 minutos.
- iii. Aspirar con cuidado la capa de linfocitos (ver anexo C)
- iv. Luego proceder a transferir la capa de linfocitos a un tubo de centrifuga, agregando 10 mL de PBS y mezclar cuidadosamente.
- v. Centrifugar a 1400 rpm por 5 minutos
- vi. Aspirar el sobrenadante y descartarlo.
- vii. Resuspender las células en 2 ml de RPMI, y aforar hasta 15 mL.
- viii. Centrifugar la suspensión a 1400 rpm por 5 minutos
- ix. Aspirar el sobrenadante y descartarlo.
- x. Resuspender las células en 2 ml de RPMI-FBS, y aforar a 10 mL.

### b. Conteo celular

- i. Para calcular la concentración celular se mezclaron 10  $\mu$ L de la suspensión celular con 90  $\mu$ L de la solución de Türk (factor de dilución 1:10)
- ii. Sumergir la pipeta dentro de la mezcla, permitiendo la formación de una pequeña gota en la punta de la pipeta, colocarla cuidadosamente en la superficie periférica de la cubierta de la cámara de Neubauer.
- iii. Contar microscópicamente 4 cuadrantes de la cámara y calcular la concentración celular de la siguiente manera:

Número total de células/ml = número total de células en 4 cuadrantes x 10 (factor de dilución) x  $1 \times 10^4$ .

- iv. Ajustar la concentración de linfocitos a  $5 \times 10^6$  células/ml con RPMI-FBS

### c. Reto linfoproliferativo

- i. Validación del ensayo colorimétrico

Se basa en el desdoblamiento del XTT incorporado por los linfocitos viables, tratados con las dos lectinas de actividad conocida (ConA y PHA), que se libera produciendo un compuesto cromógeno que puede dar una lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm. El aumento de absorbancia es proporcional al número de linfocitos viables.

Incubándose 7 días a 37°C con 5% de CO<sup>2</sup>, después agregar 50 µL de la solución de XTT, incubándose nuevamente a 37°C por 4 horas, posteriormente se lee espectrofotométricamente a 450 nm, comparándose la viabilidad con el aumento de absorbancia.

ii. Validación de la metodología manual

Esta metodología se basa en el conteo celular directo (determinación de células sanguíneas por unidad de volumen). Se determinó el número de células sanguíneas de cada lectina y el control negativo, siguiendo el procedimiento del inciso b. Se consideró un resultado positivo cuando se produjo un aumento o disminución del recuento comparado con la lectina y el control negativo. Cada ensayo se realizó por triplicado con una concentración máxima de extracto de 1 mg/mL.

## **2. Ensayo hemolítico para la Valoración de la Actividad del Sistema de complemento**

### **a. Determinación hemolítica para la actividad de la vía clásica del complemento.**

i. Sensibilización y preparación de la suspensión de eritrocitos

- Mezclar 2 mL de eritrocitos de carnero en Alsever con aproximadamente 8 mL de solución salina.
- Centrifugar a 2500 rpm (1250x g) por 5 minutos
- Remover el sobrenadante, resuspender el pelet en 10 mL de solución salina y centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos. Repetir este paso una vez, después mantener el pelet de células empacadas sobre hielo.
- Suspender 200 µL de células empacadas en 9.8 mL de VSB<sup>++</sup>
- Mezclar 100 µL de esta suspensión con 4.9 ml de solución salina.

- Medir la densidad óptica (DO) a 410 nm. Una  $DO_{410}$  de 0.522 corresponde a una suspensión de eritrocitos de carnero de  $4 \times 10^8$  células/mL. Mantener la suspensión eritrocítica en hielo.
  - Sensibilizar la suspensión eritrocítica con amboceptor, utilizando una mezcla de 1 mL de amboceptor (1:100) y 7 mL de VSB<sup>++</sup>, agregar 8 mL de la suspensión eritrocítica, incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugar; después lavar con VSB<sup>++</sup> tres veces
  - Preparar una suspensión de eritrocitos a una concentración de  $1.15 \times 10^8$  células/mL y mantenerlos en hielo hasta su utilización.
  - Agregar 100  $\mu$ L de muestra en los pozos respectivos y realizar diluciones seriadas, partiendo de una concentración de 500  $\mu$ g/mL.
- ii. Preparación de controles para la medición de actividad sérica
- Agregar 50  $\mu$ L de VSB<sup>++</sup> a los pozos H1-H6 (actividad del suero)
  - Agregar 100  $\mu$ L de VSB<sup>++</sup> a los pozos H7-H9 (0% de hemólisis)
  - Agregar 100  $\mu$ L de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis)
- iii. Preparación de la dilución del suero y preincubación
- Agregar 50  $\mu$ L de suero inactivo (63  $\mu$ L de suero inactivo mezclado con 5 ml de VSB<sup>++</sup>) a los pozos H4 – H6 y blancos de muestra.
  - Mezclar 125  $\mu$ L de la mezcla de suero humano (activo) con 10 mL de VSB<sup>++</sup>, y agregar de ésta 50  $\mu$ L a los pozos control y muestra problema.
  - Cubrir la placa y preincubar a 37°C por 30 minutos (ver anexo D).
- iv. Incubación
- Después de la preincubación agregar 50  $\mu$ L de la suspensión de ShEA a cada pozo.
  - Incubar a 37°C por 60 minutos, cubrir la placa
  - Centrifugar la placa a 2500 rpm por dos minutos

- v. Medición de hemólisis
- Agregar 200  $\mu\text{L}$  de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.
  - Transferir 50  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes a la placa correspondiente.
  - Medir la densidad óptica (DO) a 405 nm en lector ELISA

**b. Determinación hemolítica para la actividad de la vía alterna del complemento**

- i. Preparación de la suspensión de eritrocitos
- Lavar tres veces los eritrocitos de conejo con solución salina.
  - Preparar con los eritrocitos una suspensión a una concentración de  $1.15 \times 10^8$  células/mL. Mantener en hielo hasta su utilización.
  - Agregar 100  $\mu\text{l}$  de muestra en los respectivos pozos y realizar diluciones seriadas iniciando con una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$ .
- ii. Preparación de controles para medición de la actividad sérica
- Agregar 50  $\mu\text{L}$  de solución tampón (EGTA-VB) a los pozos H1 – H6 (actividad del suero)
  - Agregar 125  $\mu\text{L}$  de EGTA- VB a las filas H7-H9 (0% de hemólisis)
  - Agregar 125  $\mu\text{L}$  de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis)
- iii. Preparación de la dilución del suero y preincubación
- Agregar 25  $\mu\text{L}$  de solución de suero inactivo (mezclar 500  $\mu\text{L}$  de suero inactivo con 500  $\mu\text{L}$  de EGTA-VB) a los pozos H4 –H6 y blancos de muestra.
  - Mezclar 1 mL de suero activo con 1 mL de EGTA-VB, y añadir 25  $\mu\text{L}$  de ésta a los pozos control y muestra problema.
  - Cubrir la placa y preincubar a 37°C por 30 minutos.
- iv. Incubación

- Después de la preincubación se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de la suspensión de eritrocitos de conejo a cada pozo.
  - Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, cubrir la placa
  - Centrifugar la placa a 2500 rpm por dos minutos
- v. Medición de hemólisis
- Agregar 200  $\mu\text{L}$  de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.
  - Transferir 50  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes a la placa correspondiente.
  - Medir la densidad óptica (DO) a 405 nm en lector ELISA

### c. Cálculos

- i. Determinación de la actividad sérica expresada como porcentaje de lisis.

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

- ii. Actividad inhibitoria de la muestra vrs. Control.

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

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

- iii. Cálculo de  $\text{CI}_{50}$

Se realiza la gráfica de % de inhibición vrs. Log de concentración, con la recta de regresión lineal obtenida (al menos 4-5 valores significativos) se extrapola el valor del 50% de inhibición para obtener el  $\text{CI}_{50}$ .

## D. DISEÑO ESTADÍSTICO

1. Tipo de estudio: Experimental

Diseño no probabilístico accidental: para el muestreo de sangre periférica y sueros humanos se utilizó al donante sano disponible al momento de ejecutarse la fase experimental. Se solicitó su consentimiento para ello.

## 2. Validación de métodos

### a. Ensayo linfoproliferativo

Para ello se utilizaron las lectinas ConA y PHA, blanco o control negativo.

Número de grupos: 3 grupos con dosis única de 1mg/mL

Grupo A: Lectina Con A

Grupo B: Lectina PHA

Grupo C: control negativo

La distribución fue de la siguiente forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												

Cada lectina se repitió 12 veces (la que presentó mejor actividad se utilizó como control positivo en la siguiente fase), la fila C correspondiente al control negativo, fueron pozos sin lectina.

*Unidades experimentales:* Linfocitos

*Respuesta a medir:* Recuento linfocitario

*Número de réplicas* 12 por grupo

Para las muestras se correrán 6 grupos conformados como sigue:

Grupo A: lectina como control positivo

Grupo B: blanco o control negativo

Grupo C: Extracto etanólico de *P. aureum* (rizoma)

Grupo D: Extracto etanólico de *P. aureum* (fronda)

Grupo E: Extracto etanólico de *P. decumanum* (rizoma)

Grupo F: Extracto etanólico de *P. decumanum* (fronda)

Se determinó la concentración efectiva mínima a los extractos que mostraron efecto inmunomodulador, confrontándolos a diferentes concentraciones: 500, 250, 125, 62.5 31.2 y 15.7  $\mu\text{g/mL}$ , siguiendo el diseño descrito anteriormente.

b. Ensayo hemolítico para la evaluación de la actividad del sistema de complemento.

Se realizó una curva, mostrando la actividad sérica del pool de suero humano normal a emplear. Eligiéndose la concentración que demostró una actividad comprendida entre 30-70%, que se tomó como control de la funcionalidad de todos los componentes del sistema de complemento presentes en el suero. Como control positivo se utilizó agua desmineralizada (100% de hemólisis) y buffer como control negativo (0% de hemólisis). Se efectuó por cuadruplicado cada ensayo. Y donde se determinó y detectó actividad inmunomoduladora, se evaluaron rangos de concentración iniciando con 500  $\mu\text{g/mL}$  diluyéndose cinco veces la solución madre (1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243) también por cuadruplicado.

## E. ANÁLISIS DE DATOS

### 1. Ensayo linfoproliferativo

Se realizó de acuerdo a la siguiente escala:

Porcentaje de estimulación o inhibición de 0-25% no significativo = inalterado

Porcentaje de estimulación de 25-30% = E +/-

Porcentaje de estimulación de 30-100% = E +

Porcentaje de estimulación de 100-200% = E ++

Porcentaje de estimulación de > 201% = E +++

Porcentaje de inhibición de 25-30% = I +/-

Porcentaje de inhibición de 31-50% = I +

Porcentaje de inhibición de 51-75% = I ++

Porcentaje de inhibición de 76-100% = I +++

Las respuestas a medir fueron Positiva si el extracto aumentó o disminuyó la proliferación de los linfocitos y Negativa si la proliferación no es alterada, por el extracto.

## 2. Ensayo hemolítico para la Valoración del Sistema de Complemento

Las respuestas a medir fueron Positiva si el extracto aumentó o disminuyó la concentración de hemoglobina liberada comparada frente a la actividad sérica y el control negativo; y Negativa si no hay alteración.



## VIII. RESULTADOS

Para comprobar la presencia o ausencia de actividad Inmunomoduladora, se corrieron dos ensayos: el primero, un ensayo linfoproliferativo utilizando Concanavalina A (ConA) como control positivo por su actividad mitogénica y el segundo un análisis hemolítico sobre el sistema de complemento, en el que se empleó una mezcla de suero humano como control positivo.

Los resultados de cada ensayo se presentan en las siguientes tablas. En la tabla No. 1 se muestra los datos obtenidos con las dos diferentes metodologías aplicadas para el ensayo linfoproliferativo:

**Tabla No. 1 Actividad Inmunomoduladora para el ensayo linfoproliferativo**

<b>Planta</b>	<b>Actividad 1 mg/ml (Método Manual)</b>	<b>Actividad 1 mg/ml (Método con XTT)</b>
<i>P. pseudoaureum</i> (rizoma) Guatemala	*I +++	I +++
<i>P. pseudoaureum</i> (fronda) Guatemala	I +++	I +++
<i>P. decumanun</i> (rizoma) Honduras	** E +	-
<i>P. decumanum</i> (fronda) Honduras	E +	E +

\* Inhibición, I +++ = 76-100%

\*\* Estimulación, E + = 30-100%

Se determinó la Concentración Efectiva Mínima (CEM) utilizando diferentes concentraciones de los extractos para ambas metodologías, siendo estas de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.2 µg/mL y 15.7 µg/mL, éstos resultados se muestran en las tablas No. 2 y 3.

**Tabla No. 2 Determinación de la Concentración Efectiva Mínima (CEM) de los extractos que mostraron actividad sobre la actividad linfocítica con el método manual**

<sup>1</sup> Porcentaje de inhibición de 51-75 % = I ++

Planta	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62.5 µg/ml	31.2 µg/ml	15.7 µg/ml
<i>P. pseudoaureum</i> (rizoma) Guatemala	I ++ <sup>1</sup>	I + <sup>2</sup>	I +	I +	I +	I ± <sup>3</sup>
<i>P. pseudoaureum</i> (fronda) Guatemala	I ++	I ++	I ++	I +	I +	- <sup>4</sup>
<i>P. decumanun</i> (rizoma) Honduras	E + <sup>5</sup>	E +	E +	E +	E +	E +
<i>P. decumanum</i> (fronda) Honduras	E +	E +	E +	E +	E +	E +

<sup>2</sup> Porcentaje de inhibición de 31-50 % = I +

<sup>3</sup> Porcentaje de inhibición de 25-30 % = I +/-

<sup>4</sup> Porcentaje de Inhibición 0-25 % = no significativo o inalterado

<sup>5</sup> Porcentaje de estimulación de 30-100 % = E +

**Tabla No. 3 Determinación de la Concentración Efectiva Mínima (CEM) de los extractos que mostraron actividad sobre la actividad linfocítica empleando el Método con XTT**

<b>Planta</b>	<b>500 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>125 µg/ml</b>	<b>62.5 µg/ml</b>	<b>31.2 µg/ml</b>	<b>15.7 µg/ml</b>
<i>P. pseudoaureum</i> (rizoma) Guatemala	I +++ <sup>1</sup>	I ++ <sup>2</sup>	I ++	I ++	I ++	I + <sup>3</sup>
<i>P. pseudoaureum</i> (fronda) Guatemala	I +++	I +++	I ++	I ++	I +	I ± <sup>4</sup>
<i>P. decumanum</i> (rizoma) Honduras	- <sup>5</sup>					
<i>P. decumanum</i> (fronda) Honduras	E + <sup>6</sup>	E +	E +	E +	E +	E +

<sup>1</sup> Porcentaje de inhibición de 76-100 % = I +++

<sup>2</sup> Porcentaje de inhibición de 51-75 % = I ++

<sup>3</sup> Porcentaje de inhibición de 31-50 % = I +

<sup>4</sup> Porcentaje de inhibición de 25-30 % = I +/-

<sup>5</sup> Porcentaje de Inhibición 0-25 % = no significativo o inalterado

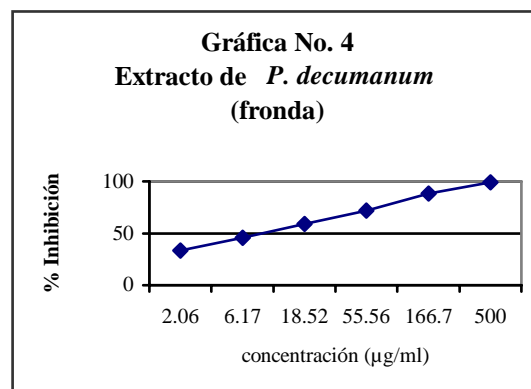
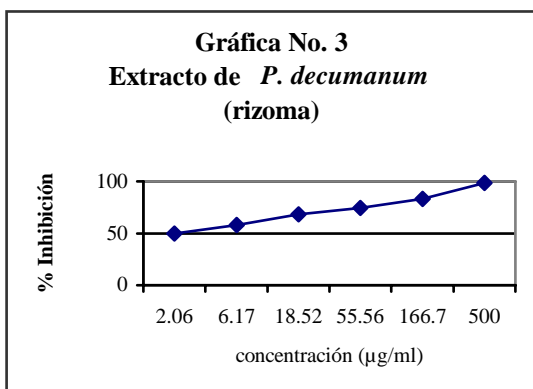
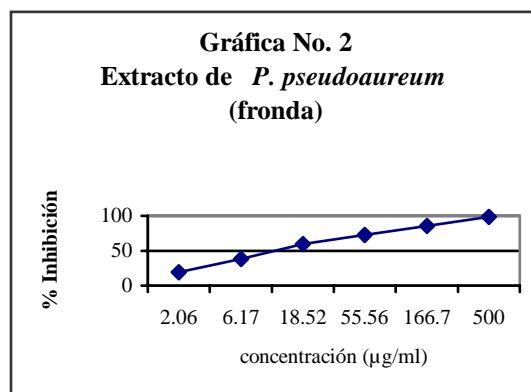
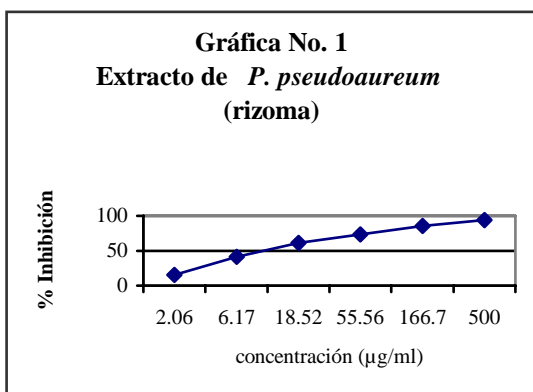
<sup>6</sup> Porcentaje de estimulación de 30-100 % = E +

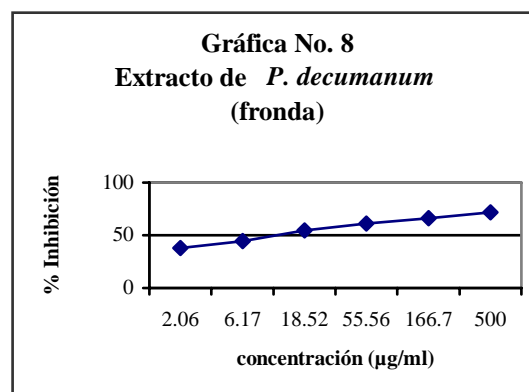
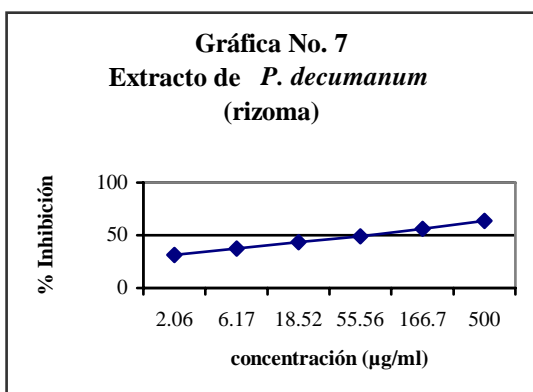
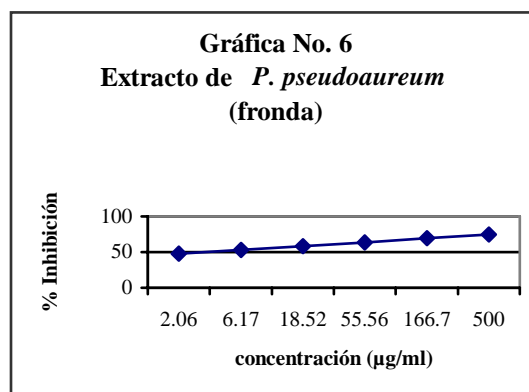
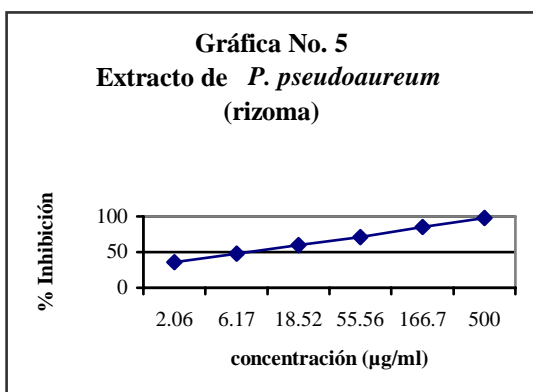
Los resultados de la actividad inmunomoduladora sobre el sistema de complemento muestran que para la vía clásica todos los extractos poseen actividad inhibitoria, mientras que para la vía alterna sólo presentan actividad tres de ellos, como se aprecia en la tabla No. 4.

**Tabla No.4 Actividad Inmunoduladora sobre el sistema de complemento de extractos etanólicos de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum* (calahuala.).**

Planta	Vía Clásica	Vía Alterna
<i>P. pseudoaureum</i> (rizoma) Guatemala	Inhibidora	Inhibidora
<i>P. pseudoaureum</i> (fronda) Guatemala	Inhibidora	Inhibidora
<i>P. decumanum</i> (rizoma) Honduras	Inhibidora	No activa
<i>P. decumanum</i> (fronda) Honduras	Inhibidora	Inhibidora

Las gráficas a continuación muestran la actividad presentada por los extractos, al evaluar ambas vías. Las gráficas No. 1 - 4 corresponden a la vía clásica y las gráficas No. 5 - 8 a la vía alterna.





Para este ensayo se determinó la Concentración Inhibitoria media ( $CI_{50}$ ), que es la cantidad de extracto necesaria para producir el 50 % de hemólisis, partiendo de una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$ , luego 166.70  $\mu\text{g/mL}$ , 55.56  $\mu\text{g/mL}$ , 18.52  $\mu\text{g/mL}$ , 6.17  $\mu\text{g/mL}$  y 2.06  $\mu\text{g/mL}$  procedimiento realizado en ambas vías (para una interpretación adecuada ver las gráficas No. 1 a 8). Los resultados se pueden observar en la tabla No. 5.

**Tabla No. 5 Determinación de  $CI_{50}$  para el Sistema de Complemento**

Planta	Vía Clásica	Vía Alterna
<i>P. pseudoaureum</i> (rizoma) Guatemala	13.84 $\mu\text{g/mL}$	7.47 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. pseudoaureum</i> (fronda) Guatemala	13.76 $\mu\text{g/mL}$	3.43 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. decumanum</i> (rizoma) Honduras	2.37 $\mu\text{g/mL}$	55.01 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. decumanum</i> (fronda) Honduras	5.50 $\mu\text{g/mL}$	12.43 $\mu\text{g/mL}$

Estos resultados sugieren que todos los extractos estudiados presentan actividad inmunomoduladora. Resumiéndolo como sigue: para el ensayo linfoproliferativo *P. pseudoaureum* (rizoma y frondas) presenta actividad de tipo inhibitorio; en el ensayo hemolítico para la valoración del sistema de complemento tanto *P. pseudoaureum* (rizoma y frondas) como *P. decumanun* (rizoma y frondas) presentan actividad inhibitoria sobre la vía clásica y vía alterna; al compararlos con el punto de corte establecido:  $CI_{50}$ , que en éste caso debe ser igual o menor a  $15 \mu\text{g/mL}$ . A excepción del extracto de rizoma de *P. decumanum*, cuya  $CI_{50}$  es mayor ( $55.01 \mu\text{g/mL}$ ).

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se evaluaron dos bioensayos para la determinación de actividad inmunomoduladora de extractos vegetales; el primero fue un ensayo linfoproliferativo en el que se llevaron a cabo dos metodologías, una manual consistente en un recuento celular en cámara de Neubauer en un microscopio convencional (28), y el segundo fue un método colorimétrico que emplea una sal de tetrazolio (XTT) para la determinación de linfoproliferación, el cual ha sido utilizado en estudios previos como el de Scuderio quien encontró que dicho reactivo provee simplicidad a los ensayos de cultivo celular *in vitro* con posible aplicabilidad para una variedad de problemas en farmacología celular y biología (29).

Se estandarizó la metodología para el ensayo con XTT, según recomendó Meza (2002), lográndose su aplicación completa, obteniendo resultados similares a los de los estudios como el de Scuderio, Mosman y Mesén entre otros (27, 29-30).

Este método es mucho más específico que la metodología manual que puede verse afectada por conteo de células no viables y la presencia de debris celular; por ser este compuesto (XTT) reducido a un producto coloreado y soluble, por la actividad enzimática mitocondrial presente en células vivas (27).

Esto quiere decir que el desdoblamiento se lleva a cabo únicamente en células vivas, lo que provee especificidad a la metodología con XTT para evaluar actividad linfoproliferativa, eliminando la interferencia causada por el conteo de células no viables.

Se encontraron algunas diferencias entre los métodos utilizados, como se pueden apreciar en los resultados mostrados en las tablas No. 1 a 3.

Si bien hay diferencias, en el caso de *P. pseudoaureum* el patrón fue similar mostrando actividad inhibitoria con ambas metodologías y cuya CEM es la misma (31.25 µg/mL) para el extracto de fronda; mientras el extracto de rizoma en la metodología manual presentó una CEM de 31.25 µg/mL y en la colorimétrica una CEM de 15.7 µg/mL.

El extracto de fronda de *P. decumanum* mostró actividad estimuladora con ambas metodologías pero al intentar obtener la CEM (tabla 2 y 3) mostró el mismo patrón en las diferentes concentraciones de muestra evaluadas; el extracto de rizoma en el ensayo con XTT no evidenció actividad alguna y en la metodología manual actividad estimuladora leve

observándose con esta metodología la misma tendencia que con el extracto de fronda; tomando en cuenta que es más específico el ensayo con XTT para la evaluación de actividad linfoproliferativa, por las inferencias que se mencionan en párrafos anteriores respecto a la metodología manual se deduce que en ambos casos (extractos de rizoma y frondas de *P. decumanum*) no se evidenció actividad linfoproliferativa; concordando con el estudio realizado por Punzón y colaboradores en el que evaluaron actividad antiinflamatoria *in vitro* de *P. decumanum* y modulación de TNF y receptores de TNF, demostrando inhibición en la secreción de citoquinas pro inflamatorias y TNF por activación de macrófagos, pero no se determinó efecto alguno sobre la actividad linfocítica (31).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan tanto en el ensayo linfoproliferativo como en el ensayo de la actividad sobre el sistema de complemento, que se explica más adelante.

El segundo ensayo consistió en la valoración del Sistema de Complemento; utilizando para ello el ensayo descrito por Klerx *et al.*, que se basa en la hemólisis de los eritrocitos por el CAM generado al activarse el complemento (32).

En este ensayo los eritrocitos actúan como activadores y células blanco, tras esta activación se produce la lisis de los eritrocitos liberando hemoglobina la cual es medida y utilizada como parámetro para medir la actividad.

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que para la vía clásica todos los extractos tuvieron un efecto inhibitorio sobre ésta (ver tabla 4), apoyando así la actividad anti-inflamatoria reportada en la literatura para calahuala; siendo los extractos de *P. decumanum* los que presentan el mayor efecto en relación a *P. pseudoaureum*; en la vía alterna ambos extractos de *P. pseudoaureum* y el de frondas de *P. decumanum* también mostraron actividad inhibitoria, mientras que rizoma de *P. decumanum* no mostró actividad, que debe ser o está indicada por una  $CI_{50}$  menor a 15  $\mu\text{g/mL}$  para ser considerada dicha actividad, como se observa en la tabla No. 5 y que puede apreciarse mejor en las gráficas No. 1 a 8.

La inhibición de la vía clásica puede deberse a varias causas siendo algunas de ellas la producción de interferencia con los componentes C1, C2, C3 C4 o IgG; la quelación de



iones  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$  evitándose así la activación del sistema del complemento; de igual manera, la estimulación de sustancias reguladoras o inhibidoras de la activación de la vía clásica del sistema del complemento; ha de tenerse en cuenta también 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 (33). Para evitar lo anterior se filtraron las muestras con filtro 0.22  $\mu\text{m}$ , minimizando así el riesgo de interferencia.

Los datos para *P. decumanum* coinciden con los reportados por Punzón y colaboradores, que fue detallado en párrafos anteriores; y los estudios de Tuominen y su equipo de trabajo en 1991 partiendo del conocimiento de su utilización en el tratamiento de psoriasis y otras enfermedades de tipo inmunológico, analizaron su efecto luego de la administración a un modelo de trasplante de piel en ratas, concluyendo que el rechazo fue significativamente prolongado, sugiriendo que los resultados se deban a un efecto inmunosupresor (24); un año después estudiaron el efecto de la adenosina, un principio activo de Calahuala sobre el factor activador de plaquetas (PAF) obteniendo que el efecto clínico en desórdenes inmunológicos puede ser explicado por la inhibición presentada por dicho factor, directa o indirectamente y que dicho principio activo puede ser uno de los responsables de la reputación de las propiedades medicinales de esta planta (25).

Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio de Liu, y colaboradores, en el que evaluaron por medio de tres bioensayos cinco especies de *Phlebodium* incluidas las del presente estudio; mostrando todas actividad inhibitoria considerable en cada uno de estos ensayos que utilizaban PAF y Leucotrieno B4 (LTB4) (34).

Ambas especies de *Phlebodium* son conocidas comúnmente como calahuala, pero provienen de regiones distintas, *P. pseudoaureum* de San Jerónimo Baja Verapaz, Guatemala y *P. decumanum* de Yohoa, Honduras, la primera crece a una altitud de 1200 a 2200 msnm y la segunda a 500 msnm, estas diferencias pudieron influir en los datos obtenidos en los ensayos efectuados, en los que *P. pseudoaureum* mostró mayor actividad sobre la vía alterna, y solo esta especie presentó actividad luego de evaluar la actividad linfoproliferativa, mientras *P. decumanum* mostró mayor actividad inhibitoria sobre la vía clásica del sistema de complemento.

Puede decirse entonces que los extractos evaluados son de interés por su efecto inmunosupresor sobre el sistema de complemento y la actividad linfocítica aunque en este último caso solo *P. pseudoaureum* mostró actividad, sugiriendo así su utilización posterior en el tratamiento de diversas enfermedades que involucren la monitorización de los niveles del sistema de complemento, especialmente los de la vía clásica por ser utilizados como indicador de actividad inflamatoria, u otras patologías en las que es necesario disminuir la excesiva estimulación del sistema inmune.

## X. CONCLUSIONES

1. Los extractos de frondas y rizomas de *P. pseudoaureum* presentaron actividad inhibidora de la actividad linfocítica *in vitro* (porcentaje de inhibición de 76 – 100 %= I+++).
2. La CEM del extracto de hojas de *P. pseudoaureum* con la metodología manual y con XTT fue de 31.2 µg/mL en ambos casos y el extracto de rizoma fue de 31.2 µg/mL con la metodología manual y 15.7 µg/mL con XTT.
3. La metodología que utiliza XTT para evaluar actividad linfoproliferativa es más específica que la metodología manual.
4. Todos los extractos evaluados mostraron actividad inhibitoria sobre la vía clásica del sistema de complemento, presentando el rizoma de *P. decumanum* una CI<sub>50</sub> de 2.37 µg/mL y frondas del mismo con 5.50 µg/mL; y frondas de *P. pseudoaureum* una CI<sub>50</sub> de 13.76 µg/mL y rizomas 13.84 µg/mL.
5. Para la vía alterna los extractos de frondas y rizoma de *P. pseudoaureum* y el de frondas de *P. decumanum* poseen actividad inhibidora sobre ésta, cada una con una CI<sub>50</sub> de 3.43 µg/mL, 7.47 µg/mL, 12.43 µg/mL respectivamente.
6. Los extractos de *P. decumanum* mostraron mayor actividad inhibitoria sobre la vía clásica del sistema de complemento respecto a *P. pseudoaureum*. Lo inverso ocurrió al evaluar la vía alterna.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Efectuar bioensayos *in vivo* que apoyen la actividad *in vitro* de los extractos de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum*
2. Realizar otros bioensayos que permitan elaborar nuevas estrategias de inmunoterapia, basados en la búsqueda de compuestos inmunomoduladores.
3. Evaluar actividad inmunomoduladora de los extractos acuosos de ambas especies tomando como base los datos proporcionados en el presente estudio.
4. A partir de un fraccionamiento guiado dilucidar los compuestos inmunomoduladores presentes en los extractos de ambas especies de *Phlebodium*.
5. Promover nuevos estudios que ayuden a explicar el modo de acción de los principios activos sobre el sistema de complemento y la actividad linfoproliferativa de los extractos analizados en este estudio.
6. Investigar la toxicidad aguda y crónica para recomendar el uso seguro de los extractos de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum*.

## XII. REFERENCIAS

1. Margani R. Fundamentos de Inmunología e Inmunoquímica. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1996. 970p.
2. Stites DP, ETR AI, Parslow TG. Inmunología Básica y Clínica. 8ed. Mérito J, trad. México: El Manual Moderno, 1996. 1099p.
3. [www.Gramon.com.ar](http://www.Gramon.com.ar)
4. Cagigas *et al.* Complemento hemolítico como indicador del estado inmunológico de niños con desnutrición energético-proteica aguda. Revista Cubana Aliment. Nutr. 1999; 13(1):29-32.
5. Weir DM *et al.* Handbook of Experimental Immunology. *In vitro* evaluation of human lymphocyte function. 4 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1986.
6. Iáñez E. Curso de Inmunología. Depto. de Microbiología. Universidad de Granada España. Disponible en <http://www.urg.es/~eiañez/inmuno>.
7. Golberg H. Fitoterapia en enfermedades del Sistema Inmunitario. Argentina. Más información en: <http://www.plantasmedicinales.org/trabrep/may2001/trabrep1.htm>
8. Wingard L *et al.* Human Pharmacology Molecular to Clinical. St. Louis, USA: Mosby Year Book Inc. 1991
9. Dale MM, Foreman JC. Textbook of Immunopharmacology. 2ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989. 3848 p.
10. Rojas W. Inmunología. 10ed. Medellín, Colombia: CIB Corporación para Investigaciones Biológicas, 1995. 438p.
11. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Section 12 Chapter 146, Biology of the Immune Systems. USA: Editorial Whitehouse Station, 1995.
12. Rose N., Friedman H. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3<sup>rd</sup> edición. USA: American Society for Microbiology, 1986. 129p.
13. Bellanti JA. Inmunología. México: Editorial Interamericana, 1986. 662p.
14. Guzmán AM. Retorno a la Medicina Tradicional. Crítica 1991; 32: 37-38.
15. Arteché A *et al.* Fitoterapia: Vademécum de prescripción. 3ra. Edición: Masson, S.A. 1998. 1148 p.

16. Cáceres A. Plantas Medicinales en Guatemala. Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala. 1996. 402p.
17. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle América. Estados Unidos de América: Charles Thomas Publisher, 1981. 536 p.
18. Sánchez C., Gupta M., Santana AI. Actividad Inmunomoduladora de las plantas (I). *Revista de fitoterapia*. 2002; 2:2: 51-63.
19. Naranjo P. Medicina Indígena y Popular de América Latina y Medicina Contemporánea. Guatemala Indígena: Instituto Indigenista Nacional, Vol. XIII, 1978. 617p.
20. Cáceres A., Giron L., Freire V., Alonzo A., Ethno botanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of ethnopharmacology* 1991: 34:173-187
21. Cáceres A., Saravia A. Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales de uso popular en Guatemala. Guatemala: Editorial universitaria (Cuaderno de Investigación 5-92, Dirección General de Investigación DIGI, USAC) 1993. 61p.
22. Cáceres A., Saravia A. Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales de uso popular en Guatemala. Guatemala: Editorial universitaria (Cuaderno de Investigación 7-92, Dirección General de Investigación DIGI, USAC) 1993. 89p.
23. Horvath A *et al.* (1967) Metabolic effects of calagualine, an antitumoral saponin of *polypodium leucotomos*. *Nature* 214:1256-1258
24. Tuominen M *et al.* (1991) Enhancing effect of calahuala on the prevention of rejection on skin transplants in mice. *Phytoterapy Research* 5: 234-236
25. Tuominen M *et al.* (1992) Effects of Calahuala and an Active Principle, Adenosine, on Platelet Activating Factor. *Planta Médica* 58: 306-310
26. Cuellar del Hoyo C *et al* (1997) *International Journal of Pharmacognosy* 35:153
27. Mesén MG *et al* Modificación de un Método Colorimétrico que usa XTT, para la Determinación de Linfoproliferación. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica.

28. Meza, N. Efecto de cinco extractos de plantas nativas usadas como adaptógenos en la actividad lifoproliferativa *in vitro*. Guatemala: Tesis *Ad gradum* Universidad de San Carlos de Guatemala. 2002
29. Scudeiro DA *et al.* Evaluation of Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res.* 1988; 48:4827 – 4833.
30. Mossman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 55 – 63.
31. Punzón C *et al.* In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *International Immunopharmacology.* 2003; 3: 1293 – 1299
32. Klerx, JP *et al.* Microscopy for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *Journal of Immunological Methods.* 1983; 63:215-220.
33. 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.
34. Liu B *et al.* Quantitative determination of antiinflammatory principles in some *Polypodium* species as a basis for standardization. *Phytomedicine* 1998; 5: 187 – 194.
35. Stolze KG (1981) Ferns and Fern allies of Guatemala, *Fieldian Botany New Series* 6:374-377.
36. Morán, R. (1996) Polypodiaceae. En: Davidse, G.; Sousa, M. & Chater, A. (Eds.) *Flora Mesoamericana.* Vol 5. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum. México p. 130-133.
37. García, C.L. (2005). Estudio de las condiciones ambientales de la calahuala (*Phlebodium* spp.) en la Sierra Caral, municipio de Morales, departamento de Izabal, Guatemala. Tesis de Maestría. USAC. 63 p.

38. Planter, 1989. *Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña*. San Salvador, Universidad de El Salvador, 468 p.
39. Budavari S. (1989). *The Merck Index* Rahway & Co, pp.1606.



## XIII. ANEXOS

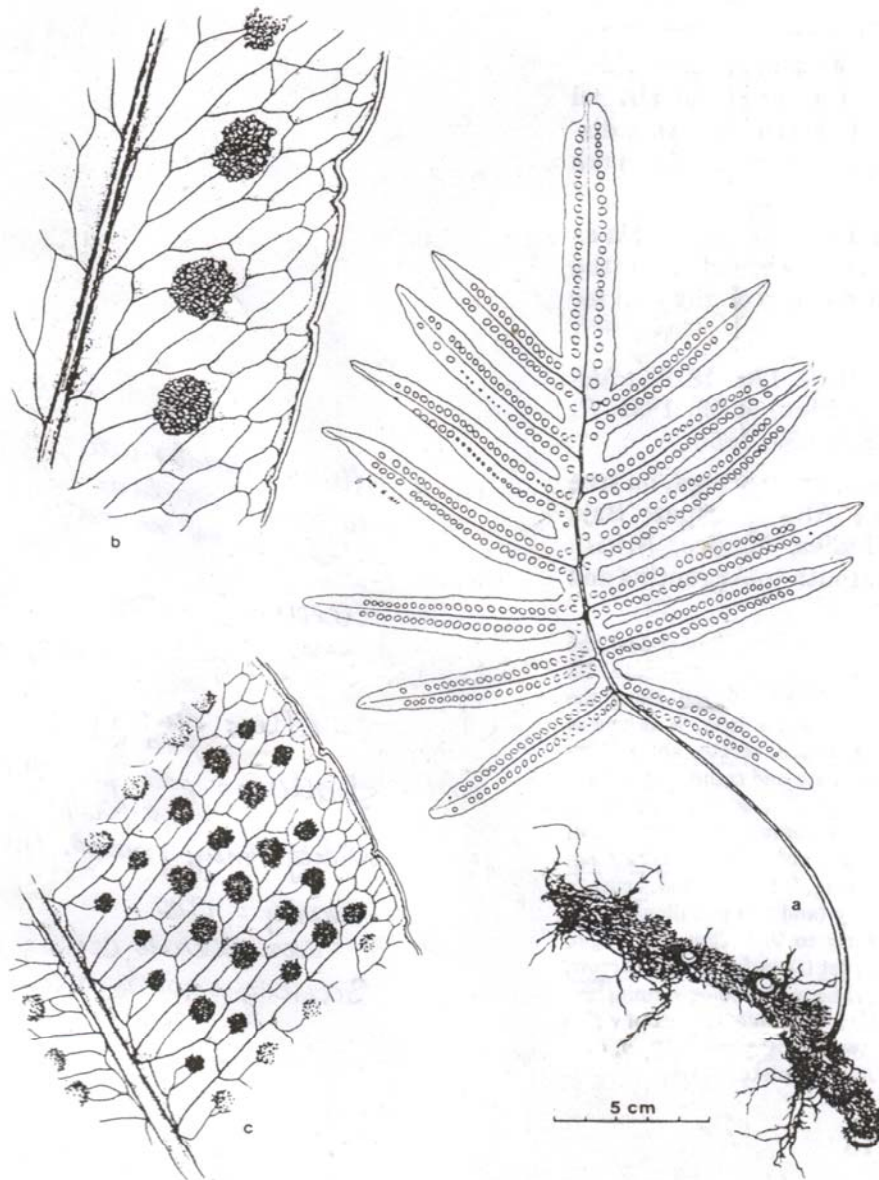
A. Dibujo de *Phlebodium pseudoaureum* y *P. Decumanum* (35).

FIG. *Polypodium* subgenus *Phlebodium*. a-b, *P. aureum*: a, habit,  $\times \frac{1}{2}$ ; b, portion of lamina showing sori and venation,  $\times 6$ ; c, *P. decumanum*, portion of lamina showing sori and venation.

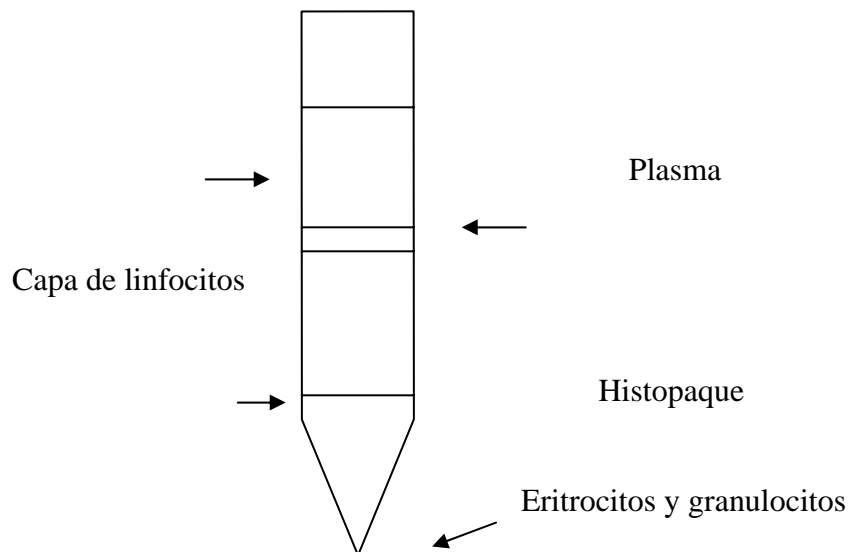
**B. Fotografía de frondas de *Phlebodium pseudoaureum*:**



Cortesía de Lic. Armando Cáceres

Proyecto Flora Regional OEA

### C. Esquema de la separación de linfocitos por gradiente de densidad



### D. Esquema de trabajo del ensayo hemolítico para la evaluación de la actividad del sistema de complemento:

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

Suero activo (Control)



Suero inactivo (blanco de muestra)



Buffer (0 % de hemólisis)



Agua destilada (100 % de hemólisis)



## E. Monografía de *Phlebodium*:

### 1. Generalidades

Pertenece a la familia *Polypodiaceae*, género *Polypodium*, algunas sinonimias son *Polypodium aureum*, *P.calahuala* L., *P. aereolatum* H&B, *P.decumanum* Willd., *P.leucotomos* Poir; se le conoce popularmente como calahuala, polipodio; es un helecho epífita que posee un rizoma rastrero y sinuoso, cubierto densamente con una pelusa dorada, café. Sus frondas son separadas, arqueadas o esparcidas sobre tallos brillantes, cafés, divididas en segmentos puntiagudos oblondos, existen ciertas diferencias entre *Phlebodium aureum* y *P.decumanum* Willd. (Anexo A), la primera crece en bósques, tronco de árboles tierra y roca musgosa y a 1200-2200 msnm, mientras que la segunda crece también en bosques y frecuentemente en pastos, praderas, tronco de árboles, en su mayor parte palma, crece a 500 msnm (16,17).

Helecho nativo de Centro América, crece silvestre en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde Florida, México y Centro hasta Sur América en alturas de 1,000-2,600 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (35).

En Mesoamérica a *P. pseudoaureum* se le ha llamado *P. aureum*, sin embargo según Morán (1996) la primera es sólo conocida de Florida, Sudamérica, las Bahamas, Puerto Rico y las Antillas Menores. *P. decumanum* y *P. pseudoaureum*, ambas diploides, han hibridizado dando origen a *P. aureum*, una tetraploide. La evidencia morfológica que sustenta este parentesco es que *P. aureum* tiene un número intermedio de series de soros (2 a 3) entre el de *P. pseudoaureum* (1 serie) y el de *P. decumanum* (3 a 7). También se señala que *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* (tratada como *P. aureum*) se ha entrecruzado en Honduras produciendo un híbrido (posiblemente *P. dictyocallis*) con 74 cromosomas no apareados, 37 de los cuales son grandes y 37 pequeños (36).

La humedad relativa promedio requerida por la calahuala es de al menos el 80%, esta condición ambiental es la que presenta menor variación a lo largo del tiempo, que se relaciona con el hábito y las condiciones de bosque nuboso. La nubosidad atmosférica

predominante tiene mayor influencia en la distribución húmeda ambiental como precipitación horizontal y no como condicionante de la luminosidad, ya que la calahuala requiere de condiciones particulares de cobertura de dosel para su establecimiento, crecimiento y desarrollo (37).

El sustrato y las demandas nutricionales de la calahuala tienen una estrecha relación, por lo que la planta requiere de un sustrato de origen orgánico con una retención de humedad mayor al 80% y más del 100% de absorción de humedad en relación al peso del mismo, un contenido de al menos 1% de nitrógeno, 1.5% de potasio, una adecuada relación de calcio y magnesio con concentraciones menores al 1% y una alta concentración de elementos menores. Las relaciones simbióticas encontradas son de tipo comensalista en el caso de los soportes arbóreos y las plantas epifitas acompañantes tipo bromelias; de depredación en el caso de los masticadores de hojas y no definida en el caso de agallas, aunque este produce una interferencia negativa por adición a la planta de calahuala (37).

## **2. Usos**

La infusión y decocción del rizoma se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis), respiratorias (asma, tos, tos ferina) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales (cálculos, hidropesía) (16).

Tópicamente se usa la infusión en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quebraduras, cáncer, cierto tipo de tumores, psoriasis y eczema. La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias. Se le atribuye propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, diurética, desinflamante, emenagogo, espasmolítica, expectorante, febrífuga, laxante, pectoral, purgante, sudorífica y tranquilizante (16).

## **3. Composición Química**

Los estudios de composición química se han realizado en algunas de las especies, pero aún es incompleto. El rizoma de *P. aureum* contiene azúcar, aceite esencial, mucílago,

almidón, nitrato de potasio y colorante rojo, además contiene calagualina, polipodina, aceites grasos y taninos, así como esteroides (ecdisterona y dos ecdisonas como la polipodaureina) (17). Las especies usadas medicinalmente en El Salvador contienen alcaloides, sesquiterpenlactonas y taninos (38).

También posee adenosina, un nucleósido distribuido en la naturaleza en formas de cristales con punto de fusión entre 234-235°C se observa a 260 nm UV, prácticamente insoluble en alcohol y en terapéutica es utilizado como antiarrítmico (36)

#### **4. Estudios realizados**

Se han realizados diversos estudios para demostrar las diversas bioactividades presentadas por este helecho y determinar sus principios activos; Horvath y colaboradores (1967) evaluaron los efectos metabólicos de calagualina una saponina antitumoral de *P.leucotomos*, encontrando que la administración de extracto puro en casos avanzados de neoplasias, produce un aumento significativo de sobrevivencia, sin detectarse efectos secundarios (23).

Tuominen y su equipo de trabajo en 1991 partiendo del conocimiento de su utilización en el tratamiento de psoriasis y otras enfermedades de tipo inmunológico analizaron su efecto luego de su administración a un modelo de trasplante de piel en ratas, concluyendo que el rechazo fue significativamente prolongado, sugiriendo que los resultados se deban a un efecto inmunosupresor (24) y en 1992 estudiaron el efecto de la adenosina, un principio activo de la Calaguala sobre el factor activador de plaquetas obteniendo que el efecto clínico en desórdenes inmunológicos puede ser explicado por la inhibición presentada por dicho factor, directa o indirectamente y que dicho principio activo puede ser uno de los responsables de la reputación de las propiedades medicinales de ésta (25).

Cuellar *et al* (1997) estudiaron el efecto del extracto acuoso de *P. leucotomos* sobre la producción de un modelo de anticuerpos específicos en ratones BALB/c inmunizados con antígenos del tercer estadio larvario de *Anisakis simplex*, decreciendo el isotipo IgG1 en animales tratados antes de la inmunización, y mucho menor en comparación a los niveles de IgG2b que aparecieron tempranamente, al inicio, y fueron ligeramente más altos

que en el grupo no tratado; después de la inmunización la reducción en los niveles de IgG1 no fue tan marcada como en la preinmunización y la subclase IgG2a mostró niveles ligeramente más altos que el grupo sin tratamiento (26).

En 1998 Liu, y colaboradores, evaluaron por medio de tres bioensayos cinco especies de *Phlebotium*; mostrando todas actividad inhibitoria considerable en cada uno de los ensayos que utilizaban PAF y Leucotrieno B4 (LTB4) (34)

Punzón y colaboradores en el 2003 evaluaron actividad antiinflamatoria *in vitro* de *P. decumanum* y modulación de TNF y receptores de TNF, demostrando inhibición en la secreción de citoquinas pro inflamatorias y TNF por activación de macrófagos, pero no se determinó efecto alguno sobre la actividad linfocítica (31). Este estudio demostró que ambas especies de *Phlebotium* (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*) poseen efecto inmunomodulador sobre el sistema de complemento y sobre la actividad linfocítica, aun cuando en este último caso solo *P. pseudoaureum* mostró actividad, (ver sección de resultados) sugiriéndose la aplicación de otros ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para continuar validando su utilización en diversas afecciones como lo reporta la literatura.