

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

**INMUNOMODULACIÓN DE LAS VÍAS CLÁSICA
Y ALTERNA DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO
POR SEIS PLANTAS MEDICINALES DE GUATEMALA**

LUISA FERNANDA LEMUS

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, mayo de 2007.

INDICE

I.	RESUMEN	2
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	5
IV.	JUSTIFICACIÓN	19
V.	OBJETIVOS	20
VI.	HIPÓTESIS	21
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
VIII.	RESULTADOS	30
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
X.	CONCLUSIONES	36
XI.	RECOMENDACIONES	37
XII.	REFERENCIAS	38
XIII.	ANEXOS	43

I. RESUMEN

Se exploraron las propiedades moduladoras de seis plantas nativas de Guatemala sobre las vías clásica y alterna del sistema de complemento. Para ello se evaluaron siete extractos etanólicos de diferentes órganos de las plantas seleccionadas: la hierba de *Cissampelos tropaeolifolia*, la hoja de *Justicia pectoralis*, la hoja de *Lippia chiapasensis*, la hoja de *Pimenta dioica*, la hoja de *Piper auritum*, y la flor y hoja de *Ternstroemia tepezapote*; mediante la aplicación de una modificación de los ensayos hemolíticos descritos por Klerx *et.al.*, estandarizada en el laboratorio del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC.

Los extractos etanólicos de la hoja de *Ternstroemia tepezapote* ($CI_{50}=3.02 \mu\text{g/ml}$) y la hoja de *Lippia chiapasensis* ($CI_{50}=13.99 \mu\text{g/ml}$) mostraron actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema de complemento. El extracto etanólico de *Lippia chiapasensis* ($CI_{50}=14.45 \mu\text{g/ml}$) mostró actividad inhibitoria de la vía alterna del sistema de complemento. Los extractos etanólicos de la hoja de *Pimenta dioica*, la hoja de *Piper auritum*, la flor de *Ternstroemia tepezapote*, la hoja de *Justicia pectoralis* y la hierba de *Cissampelos tropaeolifolia* no presentaron actividad sobre ninguna de las dos vías del sistema de complemento.

Con base en los resultados obtenidos, fue comprobada la hipótesis de que el extracto etanólico de al menos una de las seis plantas nativas de Guatemala evaluadas, posee acción inmunomoduladora sobre el sistema de complemento. Se sugiere realizar investigaciones para determinar los principios activos presentes en los extractos que proveen la actividad moduladora, apoyando la posible aplicación de estos en el manejo y tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias

II. INTRODUCCIÓN

Las nociones de Inmunología se tienen desde tiempos tan remotos como el año 400 a.C. y con el paso de los siglos fueron madurando y ampliándose sus principios hasta dar lugar a lo que actualmente se conoce como la Inmunología moderna. Esta, como casi todas las ramas de la medicina humana tiene sus cimientos en el conocimiento de la fisiología y anatomía, que darán lugar a todos los procesos de defensa del individuo ante cualquier agresión física o biológica (1).

Ante las múltiples patologías que alteran el estado de salud de una persona, se ha hecho necesario el estudio a fondo de los procesos alterados con el fin de administrar el tratamiento adecuado. Para ello, la industria farmacéutica aprovechó los conocimientos ancestrales de diferentes culturas con el fin de extraer los principios activos contenidos en las plantas, purificarlos y prepararlos para que puedan ser administrados como medicamento.

A principios del siglo XIX, los boticarios, químicos o los propietarios de herbolarios obtenían partes secas de diversas plantas, recogidas localmente o en otros continentes, fabricaban diversos preparados con estas sustancias, como extractos, tinturas, mezclas, lociones, pomadas o píldoras y algunos de ellos confeccionaban mayor cantidad de preparados de la que necesitaban para su propio uso y los vendían a granel a sus colegas.

En 1828, el químico alemán Friedrich Wöhler calentó un compuesto inorgánico, el cianato de amonio y logró producir urea, que anteriormente sólo se había conseguido aislar a partir de la orina. Esa síntesis revolucionaria hizo que se intentaran sintetizar otros compuestos orgánicos. Para la futura industria farmacéutica tuvo gran importancia este descubrimiento, siendo el comienzo de la era de la síntesis de medicamentos (2).

Lamentablemente se ha observado que una buena parte de estos productos químicos presenta efectos secundarios indeseables que no suelen ser reportados por la medicina tradicional.

Esto constituyó el principal motivo por el que la comunidad científica comenzara desde hace algunas décadas a considerar la importancia de la medicina biológica y la búsqueda de propiedades medicinales en las plantas y productos biológicos, los cuales en su estado natural, sufren interacciones con otros factores naturales presentes, favorables a la acción curativa sin

presentar efectos secundarios.

La inmunomodulación es la modificación del curso espontáneo de las reacciones inmunitarias y las sustancias inmunomoduladoras son aquellas capaces de promover o deprimir la habilidad de montar una respuesta inmune. Dichas sustancias competen al estudio de la inmunofarmacología, la cual explora las alternativas químicas y naturales que representen una posibilidad terapéutica.

Teniendo como base lo anterior, se realizó la presente investigación en la cual se exploraron las propiedades moduladoras de los extractos de seis plantas nativas de Guatemala sobre las vías clásica y alterna del sistema de complemento, como un primer paso en la utilización de estos productos para controlar enfermedades relacionadas con el mecanismo de respuesta inmune. Dada la vasta riqueza natural y cultural de Guatemala, sigue vigente el uso tradicional de miles de plantas para el beneficio de la comunidad.

III. ANTECEDENTES

A. RESPUESTA INMUNE

El sistema inmunitario consta de varias líneas de defensa: la inmunidad innata es una línea de defensa que permite controlar la mayor parte de agentes patógenos. La inmunidad adquirida suministra una respuesta específica frente a cada agente infeccioso. Esta posee memoria inmunológica específica 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 por agentes patógenos, así como una protección biológica por medio de la microbiota natural que posee. Estas barreras naturales incluyen barreras anatómicas como la piel y las membranas mucosas, el pH ácido de algunas regiones del cuerpo expuestas a agentes bacterianos, la barrera de temperatura, sustancias antimicrobianas como lisozimas y lisinas entre otras. Por otro lado, la microbiota normal del organismo evita la colonización del hospedero por microorganismos exógenos (1,2).

B. SISTEMA INMUNE

1. Inmunidad innata, natural o inespecífica

Si el microorganismo o partícula extraño logra atravesar la piel y los epitelios, se pone en marcha el sistema de inmunidad natural (inespecífica o innata), en el que participan células y factores solubles por medio de sistemas de endocitosis, fagocitosis, activación del complemento por la vía alterna o por medio de reacciones de inflamación aguda. Las células que actúan a este nivel son fagocitos (polimorfonucleares neutrófilos y monocitos) y células asesinas naturales (NK); al mismo tiempo los factores solubles que se activan incluyen las proteínas de fase aguda y el sistema de complemento.

2. Inmunidad adoptiva, adquirida o específica

Algunos microorganismos no desencadenan activación del complemento por la ruta

alterna y no pueden ser lisados porque no llegan a ser opsonizados por la proteína C3b. Incluso existen microorganismos que escapan al control de los fagocitos. Para enfrentarse con estos "invasores", el sistema inmune ha desarrollado en los mamíferos una barrera defensiva adicional, que son los anticuerpos (Ac).

En cada tipo de anticuerpos existen 3 regiones: una que reconoce específicamente a cada invasor y dos con funciones biológicas: unión al complemento, activándolo por la ruta clásica, y finalmente la unión a fagocitos.

En la inmunidad específica se dan dos tipos de respuesta:

- a) Inmunidad específica humoral: Los anticuerpos son los mediadores de la inmunidad específica humoral, producidos por las células plasmáticas, diferenciadas a partir de los linfocitos B. La inmunidad humoral, por sí misma, sería de poca utilidad frente a patógenos intracelulares, bien sea los estrictos (virus) o facultativos (como los *Mycobacterium* o muchos protozoos, como las *Leishmania*). Para ello ha evolucionado un sistema de inmunidad celular, que está mediado por linfocitos T, parecidos citológicamente a los B, pero que se diferencian en el timo.
- b) Inmunidad específica celular: La unión entre el antígeno y el anticuerpo específico provoca la activación de los efectores específicos celulares, los linfocitos T. Estos reconocen al antígeno (Ag) extraño siempre que esté situado sobre la superficie de células del propio organismo hospedero, pero no pueden reconocer al Ag por sí solo, sino que éste ha de estar en combinación con una molécula marcadora de la superficie celular. Las moléculas marcadoras de superficie pertenecen al llamado sistema principal de histocompatibilidad (MHC, de "Major Histocompatibility Complex"). Los linfocitos T, al igual que los B, se seleccionan y se activan combinándose con el antígeno (aunque necesitan junto a él moléculas MHC), lo que provoca su expansión clonal.

Finalmente a la activación específica humoral o celular se sucede una serie de mecanismos específicos de ataque contra el agente inmunogénico:

- la activación del complemento por la ruta clásica, que puede conducir, al igual que en la ruta alterna, a la lisis del microorganismo invasor
- opsonización (recubrimiento) de los fagocitos con complejos Ag-Ac, lo cual facilita la fagocitosis
- neutralización directa de ciertas toxinas y virus por la simple unión Ag-Ac. Obsérvese que los dos primeros efectos son formas que tiene el sistema específico de "aprovechar" elementos del sistema de inmunidad innata, mediante los cuales determinados elementos de este sistema inespecífico son "encarrilados" mediante los anticuerpos (que son específicos) hacia el foco de la infección de un determinado microorganismo, para su eliminación (1-3).

C. SISTEMA DE COMPLEMENTO

Se llama sistema de complemento a una serie de aproximadamente 30 proteínas que forman un sistema enzimático que puede encontrarse tanto en plasma como en la superficie de células. Está caracterizado por la rápida producción de una respuesta amplificada a algún estímulo que desencadenará una reacción en "cascada" en la cual el producto de una reacción es el catalizador de la producción del siguiente. Muchas proteínas del complemento existen como precursores inactivos en el suero (zimógenos), y otros residen en la superficie de las células. Estas proteínas constituyen el 10% de las proteínas séricas, con el componente C3 en mayor proporción (cerca de 1.5 mg/ml) (1,4,5).

Las funciones de este sistema incluyen la lisis de células bacterianas y virus recubiertos, inducción de inflamación, opsonización de partículas antigénicas y la producción de fragmentos peptídicos que regulan las características de la respuesta inflamatoria e inmunitaria (1,5).

Pueden distinguirse cuatro unidades en el entorno de la función del sistema, dos vías de activación, un circuito de amplificación y una ruta terminal de activación. Las dos vías de activación son conocidas como vía clásica y vía alterna (1,5).

1. Nomenclatura

Los componentes de la vía clásica y terminal se denominan con números que siguen a la letra C, los componentes de la vía alterna se identifican con letras, al igual que otras proteínas que tienen efectos reguladores en el sistema. Los componentes activados o complejos poseen una barra sobre ellos para indicar su estado de activación y los componentes inactivos están precedidos por una letra i minúscula. Los fragmentos divididos son designados con una letra pequeña luego del componente. Las cadenas polipeptídicas de proteínas del complemento se designan con una letra griega luego de la indicación del componente. Los receptores de membrana para C3 están abreviados CR1, CR2, CR3 y CR4 (1,5).

2. Vía Clásica de Activación

Esta es activada normalmente por complejos antígeno-anticuerpo, principalmente formados por inmunoglobulinas del tipo IgG1, IgG3 e IgM, junto con el microorganismo, pero también puede ser activa con ciertos microorganismos, con la presencia de heparina-protamina en iguales concentraciones, algunos polianiones y el lípido A perteneciente a los lipopolisacáridos bacterianos (llamada vía de las lectinas). La activación se inicia con la unión de la subunidad C1q a su partícula blanco, lo cual conllevará a un cambio total en la conformación del complejo con la activación subsecuente de los subcomponentes C1r y C1s. La activación del C1 es dependiente de la presencia de Ca^{2+} ya que la unión entre las fracciones r y s es a través de un ión calcio. La activación de la fracción C1 induce el fraccionamiento del componente C4 en un fragmento C4a pequeño y un C4b grande, el cual se une al blanco. En presencia de Mg^{2+} el componente C2 se une a la unión de membrana C4b se fragmenta en porciones C2a y C2b. El complejo C4b2a resultante es conocido como la C3-convertasa de la vía clásica. Este complejo enlaza y activa al C3, este a su vez se fragmenta en C3a y un C3b que queda expuesto al medio circundante, este se enlazará covalentemente al fragmento C4b de la superficie blanco y formarán un complejo que es capaz de opsonizar y aumentar la fagocitosis, además de continuar la vía de activación de la cascada. El último

complejo formado, constituido por C4b, C2a y C3b activa y causa la fragmentación del componente C5 formando un complejo conocido como C5-convertasa, del cual C5a es la fracción pequeña y que quedará libre y C5b pasa a formar parte del complejo de cascada que se encuentra disponible para interactuar con componentes posteriores del sistema. Este es el activador de la ruta terminal que dará lugar al ataque de la membrana.

La vía clásica está regulada por un inhibidor de C1 (C1INH), quien se une estequiométricamente en proporción 1:1 a C1r y a C1s para inactivar dichas proteínas permanentemente. El C1INH también une estequiométricamente a la plasmina, calicreina, al factor de activación Hageman y al factor de coagulación Xia. El factor J es una glicoproteína catiónica que también inhibe la actividad del C1. La proteína de unión C4 (C4BP) desensambla el complejo C4b,2a, permitiendo al factor I desactivar al C4b (1,4-6).

3. Vía Alternativa de Activación

Esta vía es activada por sustancias naturales como polisacáridos, bacterias, virus, endotoxinas, paredes de levaduras, factor nefrítico, factor de veneno de cobra, eritrocitos de conejo e IgA inespecífica de la respuesta inmune innata. La actividad de esta vía se basa en la presencia de bajos niveles de intermediarios de C3 extremadamente lábiles que se forman espontáneamente en el suero; cuando estos intermediarios se unen a alguna superficie adecuada forman un éster covalente que posee un sitio de unión al factor B el cual es dependiente de iones Mg^{2+} . Este factor B es similar en muchos aspectos al C2. Una tercera proteína, el factor D (semiproteasa similar a C1), es capaz de escindir el factor B generando un complejo restante que adquirirá características de C3-convertasa de la vía alternativa. Este complejo luego se escinde para liberar proteínas C3 adicionales para producir C3 que es reactivo o formar un complejo mayor denominado C3bBbC3b que tiene actividad de C5-convertasa. Este puede desencadenar subsecuentemente la cascada y promover el ataque sobre la partícula extraña a la que se une (7,8).

La C3-convertasa es muy inestable y generalmente se disocia con rapidez, no obstante una proteína plasmática llamada properdina se enlaza a esta y la estabiliza disminuyendo su degradación y permitiendo que continúe la cascada.

La vía alterna es regulada por varios factores. La properdina retarda el decaimiento del complejo C3bBb incrementando su vida media; el factor I ataca el C3b,H para degradar C3b (1,4-6).

4. Ruta terminal

Esta se inicia con la activación de C5 por las C5 convertasas formadas en cualquiera de las dos vías iniciales. Durante la activación, C5 es fragmentado en una porción pequeña C5a y una C5b que luego interactuará con C6 para formar el complejo meta-estable C5b6, éste puede unirse con C7 formando el complejo C5b67 que puede aceptar una molécula de C8 y múltiples moléculas de C9, formando finalmente un canal cilíndrico transmembranal, C5b678(9)_n llamado complejo de ataque a la membrana (CAM). Este complejo creará un canal de paso en la membrana atacada causando la muerte celular por daño a su membrana y alteración del equilibrio hidroelectrolítico (1,4-6).

El complejo CAM es regulado por una proteína llamada S o vitronectina, la cual controla la actividad de C5b-7; también es regulado por un factor homólogo de restricción (FHR), por SP40, y por el CD59 quien regula la actividad de C8,9 (1,4).

D. INMUNOMODULACIÓN

La inmunomodulación es la modificación del curso espontáneo de las reacciones inmunitarias. Las sustancias inmunomoduladoras son aquellas capaces de promover o deprimir la habilidad de un individuo de establecer una respuesta inmune o defenderse contra patógenos y tumores. Dichas sustancias competen al estudio de la inmunofarmacología, la cual explora las alternativas químicas y naturales que representen una posibilidad terapéutica útil. Su aplicación y desarrollo se debe a la asociación de desórdenes como alergias, enfermedades infecciosas, enfermedades auto inmunes y cáncer con un desbalance en el sistema inmune (1, 9-13).

1. Agentes inmunomoduladores

Los inmunomoduladores pueden dividirse en dos categorías: los específicos y los no

específicos. Los inmunomoduladores específicos son administrados junto con antígenos y bajo esta situación son conocidos como adyuvantes. Su función será la de aumentar la inmunogenicidad específica del antígeno. Los inmunoestimulantes inespecíficos del antígeno tienen efecto sobre todas las respuestas inducidas durante la fase de actividad del producto empleado. Los inmunosupresores inespecíficos se aplican simultáneamente a todas las respuestas inmunitarias mientras dura la acción del producto utilizado; esto se logra mediante la destrucción de las células linfoides, por irradiación o por inyección de productos químicos o biológicos. Los inmunosupresores específicos de antígeno se pueden utilizar como inyecciones pasivas de anticuerpos, simultáneamente con la administración del antígeno poco tiempo después (10,11,13,14).

E. PLANTAS COMO FUENTE DE INMUNOMODULADORES

La etnobotánica tiene por objeto el estudio del uso popular de la flora de una región en particular. Esta puede diversificarse al área medicinal, estudiando las posibilidades y usos tradicionales de la flora en una región o ecosistema específico. El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (16-18).

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) ha estimado que el 80 por ciento de los habitantes de los países en vías de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud (15,19-21).

Desde un punto de vista práctico las investigaciones se justifican por el hecho de que el empleo tradicional de una planta para fines curativos es una demostración de eficacia y seguridad; es decir si dicha planta es utilizada por una población para el tratamiento de una enfermedad en particular y ha sido utilizada en la misma forma por milenios, la planta debe contener la o las sustancias biológicamente activas para el tratamiento de esa enfermedad. La

importancia de la adecuada selección de plantas a investigar, en un programa de descubrimiento y desarrollo farmacéutico, radica en el tipo de terapia que se necesite (22-24).

Guatemala es un país de rica tradición en este aspecto la cual ha sido el resultado de la acumulación histórica de conocimientos aportados por la cultura indígena maya y la incorporación de aquellos traídos por los conquistadores y colonizadores españoles en el siglo XVI. Actualmente la fitoterapia de Guatemala es una parte muy importante de las comunidades rurales, pues juega un papel protagónico en la salud comunitaria, especialmente en casos de enfermedades muy comunes como las gastrointestinales y respiratorias. Las plantas medicinales que se encuentran en uso popularmente son una mezcla de especies nativas e introducidas, su aplicación es muy variada y se ve enriquecida por la diversidad de grupos étnicos existentes (23,25-27).

F. ESTUDIOS PREVIAMENTE REALIZADOS EN GUATEMALA

La flora guatemalteca constituye una importante fuente de plantas medicinales utilizadas empíricamente desde la época de los mayas, es por ello que en los últimos años instituciones como el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya, la Facultad de ciencias Químicas y Farmacia y el Centro Mesoamericano sobre Tecnología Apropriada (CEMAT) han mostrado interés en la realización de trabajos de investigación que exploran el potencial de algunas de ellas como agentes antimicrobianos y antiparasitarios, moduladores de la respuesta inmunológica y de sistemas como el complemento. De dichos trabajos se ha reportado que los extractos etanólicos de hoja y raíz de *P. alliacea*, hoja de *S. americanum*, hoja de *P. aureum* y hoja de *S. glauca* presentan actividad inhibidora de la vía clásica al mismo tiempo que activan la vía alterna del sistema de complemento (Osorio, 2003; Castillo, 2003); el extracto de raíz de *D. contrajerva* y rizoma de *P. decumanun* poseen actividad inhibidora de la vía clásica del sistema de complemento (Castillo, 2003; Alvarez, 2006); los extractos de frondas y rizoma de *P. pseudoaureum* presentan actividad inhibitoria de la actividad linfocítica *in vitro* y las vías clásica y alterna del sistema de complemento; y el extracto de fronda de *P. decumanun* mostró actividad inhibidora de las vías clásica y alterna del mismo sistema (Alvarez, 2006) (28-30).

G. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO

La actividad del sistema de complemento puede ser evaluada en diferentes formas: puede evaluarse cualquiera de sus vías de activación como tales o bien puede hacerse la medición específica de sus componentes. El principio más utilizado en los ensayos de evaluación se basa en la cuantificación de lisis total y análisis inmunoquímicos posteriores. Sin embargo estos últimos no proveen indicaciones de la integridad de las moléculas involucradas. Es por ello que además de éstos, actualmente puede utilizarse ensayos de tipo hemolítico con los cuales evalúan la funcionalidad de las distintas vías del sistema.

1. Ensayos hemolíticos

Estos ensayos están basados en la metodología descrita por Klerx *et al* (1983), los cuales son pruebas *in vitro* basadas en la hemólisis de los eritrocitos por el CAM generado luego de la activación del sistema de complemento. Los eritrocitos actuarán simultáneamente como activadores y como células diana ya que poseen antígenos de superficie que provocan una reacción antígeno-anticuerpo específica, dando lugar a una lisis y por ende liberación de hemoglobina la cual es cuantificable. El parámetro que se utiliza como medida de la actividad del complemento es la absorbancia de la hemoglobina liberada. En base a esto puede calcularse el porcentaje de inhibición y la concentración de muestra necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria o CI_{50} . El ensayo de evaluación de la vía clásica utiliza eritrocitos de carnero sensibilizados con Amboceptor, el cual consiste en anticuerpos contra eritrocitos de carnero; dicho complejo antígeno-anticuerpo activa los componentes de la vía clásica presentes en la mezcla de suero normal (MSH) y el buffer que se utiliza es la fuente de los cationes divalentes Ca^{+2} y Mg^{+2} necesarios para la activación de la vía. El ensayo de evaluación de la vía alterna es similar al de la vía clásica y dependerá de la lisis de eritrocitos de conejo o cobayo no sensibilizados. En este se inactiva previamente la vía clásica mediante la adición de EGTA (ácido etilenglicol tetracético) para quelar calcio y magnesio, ambos necesarios para su activación; además se utiliza una mezcla de suero humano (MSH) con eritrocitos de conejo o cobayo, los cuales poseen membranas activadas que permiten la protección del complejo C3Bb del factor H permitiendo el ensamblaje al complejo de ataque a la membrana (4,5,6,31).

2. Ensayos de fijación de complemento

Utilizados como una herramienta útil en diagnóstico, se basan en la fijación del complemento durante la interacción del antígeno y el anticuerpo. En una primera etapa el suero del paciente es calentado para desnaturalizar las enzimas del complemento, luego los antígenos y una cantidad conocida de complemento son añadidos para luego ser incubados, finalmente se añade eritrocitos de carnero y se continúa la incubación. Si el sistema de complemento ha sido activado por la presencia de un complejo Ag-Ac presente en el suero del paciente la actividad hemolítica del complemento será agotada y no habrá lisis de los eritrocitos; por el contrario, si no hay complejo Ag-Ac en el suero los eritrocitos de carnero serán hemolisados (1,4).

H. PLANTAS A UTILIZAR EN EL ESTUDIO

1. *Cissampelos tropaeolifolia*

Conocida como Curarían, Cuxogui, Guaco, Ixcatú-can, Oreja de ratón y Tamagás. Es una enredadera con raíz grande, retorcida, café, leñosa ramificada, amarga; de tallo delgado y peludo. Hojas alternas acorazonadas o arriñonadas, de 3-12 cm de ancho y sedosa de ambos lados. Flores pequeñas, masculinas amarillas, en espigas axilares delgadas ramificadas; femeninas en grupos más pequeños y simples. Fruta casi redonda, de 4-5 cm de largo, rojo o naranja aterciopelada. Utilizada en casos de mordeduras de culebra, diabetes, ictericia, reumatismo, gonorrea, ayuda al parto, previene abortos, taquicardia, problemas del tracto gastrointestinal y tracto respiratorio, piel, fiebre, malaria, trastornos renales. Se le atribuyen propiedades antieméticas, antiséptica, aperitivas, digestivas, diurética, expectorante, febrífuga, emenagoga, tónica, sudorífica y vermífuga (16, 32).

2. *Justicia pectoralis*

Conocida como Tilo o Tila (Guatemala); Trevo-cumarú (Brasil: Amazonas); Yakayú (Colombia: Puinaves); Patco (Perú); Yerba carpintero, Curia, Camaguari (Venezuela). Es una hierba que puede alcanzar 1 m de altura, poco ramificada; hojas lanceoladas, acuminadas en el ápice y obtusas en la base; inflorescencia terminal erecta con numerosas flores pequeñas de

color rosado; el fruto es una cápsula pequeña de color marrón. *Justicia* es un género muy extendido en las zonas tropicales y subtropicales; son hierbas y arbustos que generalmente tienen aceites aromáticos, por lo que son utilizados en perfumería o como repelentes e insecticidas. Varias especies son empleadas como alucinógenos por los indígenas del Orinoco y el Amazonas, y otras tienen propiedades medicinales. Entre los constituyentes más importantes se ha identificado la presencia de lignanos y saponinas con posibles efectos inhibidores de la fertilidad en las mujeres. El naftaluro lignano se ha asociado con actividad antidepressiva y antiarrítmica. En algunas especies se han aislado varias aminas aromáticas, kaempferol, esteroides, ácido salicílico y alcohol alifático. Los estudios químicos del género *Justicia* son todavía incipientes en relación con su uso como alucinógeno; algún trabajo ha reportado la presencia de tryptaminas (Schultes y Raffauf, 1990). Los análisis preliminares de *Justicia pectoralis* demuestran la presencia de esteroides, mucílagos y un aceite esencial (Albornoz, 1993). Acción expectorante, pectoral, béquico, cicatrizante, afrodisíaco y más recientemente evaluada como antioxidante. Usada para tratar gripe, tos, infecciones de las vías respiratorias superiores, dermatitis, heridas, aftas, fiebre, curación de heridas, úlceras, enfermedades nerviosas (32-36).

3. *Lippia chiapasensis*

Matorral o árbol débil de 4 m de alto, ramas densamente pubescentes, pecíolos de 4-14 mm de largo, hojas ovaladas o elíptico-ovaladas, de 2-6 cm de largo, 1.5-4.5 cm de ancho, usualmente agudas, algunas veces obtusas, usualmente en forma de cuña en la base, escabrosa por encima, usualmente densa y suavemente pubescente por debajo, nervaduras prominentes, márgenes crenados aserrados, pedúnculos de 2-4 in cada axil, densamente pubescentes de 1.5-2.5 cm de largo, las espigas de flores de 8-9 mm de ancho, en frutos de 13 mm de ancho, reniforme, de 6-9 mm de ancho, venosa puberulenta a estriatada, ciliada; cáliz de 2-3 mm de largo, hirsuto, corola amarilla, del doble de largo que el cáliz, usualmente puberulenta en el ápice y dentro el cuello (32).

4. *Pimenta dioica*

Conocida como Pimienta de Tabasco, pimienta gorda, pimentón, Malagueta, Patalolote, Pimienta de Chiapas, Pens, Ixnabacuc y Pimienta de Jamaica. Es un árbol de 6 a 10 m de alto

y de hasta 40 cm de diámetro, con el tronco recto, ligeramente acanalado, ramas ascendentes, copa irregular, densa; perennifolio; corteza externa lisa que se desprende en escamas muy delgadas y alargadas, pardo verdosa o amarillenta con manchas moreno rojizas; internamente color crema amarillento o rosado, quebradiza, de sabor amargo y olor muy fragante. Grosor total de la corteza de 4 a 6 mm; ramas jóvenes, de sección transversal cuadrada, verde grisáceas a verde oscuras, sin lenticelas, con fina pubescencia cuando jóvenes, glabras con la edad; estípulas ausentes; hojas decusadas, simples; láminas de 6 x 2.5 a 21 x 7 cm, elípticas u oblongas, con el margen entero, ápice agudo o redondeado, base aguda a obtusa; haz verde oscuro y brillante, envés verde pálido o amarillento, glabras en ambas superficies; la lámina presenta numerosos puntos glandulosos transparentes; pecíolos de 10 a 25 mm, glabros; las hojas despiden un fuerte olor fragante que perdura aun después de que se secan; flores en panículas axilares de 6 a 12 cm de largo, con las ramas cimosas, finamente pubescentes; pedicelos de 1 a 5 mm o las flores sésiles; flores actinomorfas, fragantes, de 6 mm de diámetro; cáliz verde, de 3 mm de largo, cupular en la parte interior con 4 lóbulos de 1 a 1.5 mm de largo, ovados a triangulares, pubescentes en ambas superficies; pétalos blancos, 4, de 2 a 2.5 mm de largo, insertos en el cuello del tubo del cáliz por debajo de los pétalos, glabros; ovario ínfero, bilocular, lóculos 1 a 2-ovulares; estilo grueso, de 4 mm de largo, glabro; estigma grande y capitado; flores de marzo a mayo; bayas de *ca.* 10 x 5 mm, aplanadas en el ápice, verrugosas, con el cáliz persistente; contienen 1 ó 2 semillas pequeñas; todo el fruto despide un fuerte olor fragante; maduran de junio a octubre. El fruto y las semillas contienen un aceite esencial que se utiliza como agente aromatizante. Su principal producto es el fruto aromático que se utiliza como condimento alimenticio. Se emplea como antiséptico y carminativo (que favorece la expulsión de gases en el tracto digestivo), antiinflamatorio, analgésico, antipirético, antiulceroso y actividad citoprotectora. Aumenta la mucosa gástrica en ratas. El aceite es irritante. Estudiado como analgésico, hipotensor y como tratamiento de dolor artrítico (analgésico) (32, 37-42).

5. *Piper auritum*

Conocido como Santa María, cordoncillo, hoja de jute, juniapra, xaclipur, obet, caña de oro, anisillo, hinojo, sabalero, hoja de la estrella, acullo cimarrón (Guatemala), Hierba santa, hoja santa, hua'a (zapoteco, Oax.), acullo cimarrón, Shó'nná (Mazateco, Oax.),. Hierba

áspera, algo suculentas, dispersamente ramosas, o raramente leñosa en la parte baja y aparenta ser un árbol, comúnmente cerca de 2 m de alto pero ocasionalmente hasta de 6 metros, las ramas robustas, esparcidamente pubescentes o glabras; las hojas sobre cortos o alargados, pecíolos robustos, los pecíolos ampliamente alados, más o menos dilatados y envainando la base; lámina de las hojas muy largas, finas y suave, usualmente verde-amarillo brillante cuando secas; ampliamente ovadas o oblongo-ovadas, hasta de 60 cm de largo y 35 cm de ancho, pero usualmente mucho más pequeñas, agudas o abruptamente corto-acuminadas, profunda y estrechamente cordadas en la base, los lóbulos basales redondeados, uno de ellos se extiende 1.5-3 cm, más bajo en la costa que los otros, ligeramente pálido en el envés, suavemente puberulento o cortamente-piloso en ambas superficies, con usualmente 3 pares de nervios arriba de los basales; pedúnculos simples, opuestos a las hojas, cerca de 3 cm de largo; espigas verde pálidas, 4 mm de espesor, comúnmente 20-25 cm de largo, las escamas peltadas pálidas puberulentas. Las hojas son usadas como condimento y como envoltura de algunos alimentos (tamales). Las hojas y ramas se utilizan como medicinales en el tratamiento de heridas, infecciones vaginales, cáncer, encono; en combinación con hierba santa cimarrona y con “tlacopetla” se utiliza para piquete de alacrán, para el dolor de muela, para el dolor de estómago; se aplica sobre afecciones de la piel; también se emplea para padecimientos como inflamación vaginal, infección de la matriz, galactógeno (aumentar la leche de las mujeres que amamantan) y para acelerar el parto, mediante las hojas remojadas en alcohol; se usa para trastornos del aparato digestivo como dolor de estómago, falta de apetito, estreñimiento, diarrea e inflamación de estómago; se dice además que es un buen remedio para la bronquitis, tos y para la fiebre, afecciones como asma, laringitis, reumatismo, desparasitante, llagas e irritación ocular; los tallos y las hojas se utilizan en el tratamiento del susto. Investigada ampliamente por su acción antiespasmódica en intestino (32, 43-52).

6. *Ternstroemia tepezapote:*

Conocida como Tila o Tilo, baratillo, trencillo, trompillo, chucul, hualicuo, uixlilil-caax, pañol, chique, roble, Craboo. Matorral o árbol, a veces de 15 m de alto, con un tronco de 15 cm o más de diámetro, hojas oblongo-ovalado, de 7-16 cm de largo y 3-4 cm de ancho, obtusa o redondeada en el ápice o a veces subaguda, cuneada o atenuada en la base, las nervaduras inconspicuas en ambas superficies, algunas veces impresas por debajo, pedículos de 1.5-2.5

cm de largo, pétalos lanceolados u ovalados, de 8 mm de largo, agudos, unidos a la mitad, ovarios de 2 celdas, con 4-5 óvulos por celda, estilo de 6-7 mm de largo, estigma puntiforme, fruto cónico u ovoide-cónico, de 1-2 cm de largo, 1-1.5 cm desde arriba hasta la base. Utilizado como remedio para picadura de serpiente, tranquilizante (32,53,54).

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país poseedor de una vasta flora, cuyos productos han sido usados ancestralmente con fines medicinales, de los cuales se han reportado resultados satisfactorios. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal y único recurso disponible. A raíz de esto se hizo necesaria una mayor profundización en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades terapéuticas.

El uso de productos naturales para el tratamiento de todo tipo de patologías hace evidente una ventaja más respecto de los productos sintéticos, ya que los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí, de tal forma que en general no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados.

Una de las posibilidades con mayor potencial terapéutico que se estudian en la actualidad es la inmunomodulación; ésta contempla la evaluación de la actividad amplificadora o inhibitoria de los principios activos de algunas plantas sobre los mecanismos de inmunidad propios del organismo tales como el sistema de complemento. El presente estudio exploró esta posibilidad, debido a la constante necesidad de alternativas terapéuticas para patologías en las cuales el sistema de complemento juega un papel decisivo en la fisiopatología.

V. OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad inmunomoduladora sobre el sistema del complemento de seis plantas nativas de Guatemala.

J. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad moduladora de los extractos de *Cissampelos tropaeolifolia*, *Justicia pectoralis*, *Lippia chiapasensis*, *Pimenta dioica*, *Piper auritum* y *Ternstroemia tepezapote* sobre la vía clásica del complemento.
- Determinar la capacidad moduladora de los extractos de *Cissampelos tropaeolifolia*, *Justicia pectoralis*, *Lippia chiapasensis*, *Pimenta dioica*, *Piper auritum* y *Ternstroemia tepezapote* sobre la vía alterna del complemento.
- Determinar la concentración necesaria de extracto evaluado para provocar la lisis de 50% de los eritrocitos (CI₅₀).

VI. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de al menos una de las seis plantas nativas de Guatemala evaluadas en el presente estudio, posee acción inmunomoduladora sobre el sistema de complemento.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO

Seis plantas medicinales nativas de Guatemala.

1. Muestra

Extractos etanólicos obtenidos de la hierba de *Cissampelos tropaeolifolia*, la hoja de *Justicia pectoralis*, la hoja de *Lippia chiapasensis*, la hoja de *Pimenta dioica*, la hoja de *Piper auritum* y de la flor y la hoja de *Ternstroemia tepezapote* preparados por la investigadora.

B. RECURSOS

1. Recursos Humanos

- a) Asesora: Licenciada Ana Margarita Paz de Ramírez
- b) Investigadora: Luisa Fernanda Lemus

2. Recursos Institucionales

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

3. Recursos Materiales

- a) Equipo
 - Cabina de bioseguridad nivel 2
 - Refrigerador a temperatura de 4-8 °C
 - Congelador a temperatura -80°C
 - Balanza analítica
 - Centrífuga (2500 rpm)
 - Incubadora a 37°C

- Autoclave
- Lector ELISA (lectura a 405 nm)

b) Materiales

- Tubos de ensayo de vidrio de 10 ml
- Tubos de ensayo de plástico de 100 ml
- Tubos eppendorf de 0.5 ml
- Pipetas Pasteur
- Cámara de Neubauer
- Pipetas de 1000 μ l, 500 μ l, 200 μ l, 100 μ l y 50 μ l.
- Puntas de pipeta de 100-1000 μ l y de 0-200 μ l.
- Placas de poliestireno de 95 pozos, estériles de fondo plano

c) Reactivos

- Eritrocitos de carnero
- Eritrocitos de conejo
- Solución stock VSB⁰ (solución tampón de veronal concentrado)
- Solución stock de Ca⁺²/Mg⁺²
- Solución stock EGTA
- Solución tampón de barbital sódico (VSB⁺⁺)
- Solución tampón de VSB y etilenglicol-bis[b-Aminoetileter-N,N,N',N'-Acido tetracético] (EGTA-VB)
- Solución Alsever
- Solución salina al 0.85%
- Pool de suero humano normal activo
- Pool de suero humano normal inactivado
- Amboceptor (anticuerpos anti-eritrocitos de carnero)
- Agua destilada y desmineralizada

C. METODOLOGÍA

Se aplicó una modificación de los ensayos hemolíticos descritos por Klerx *et.al.*,

estandarizada en el laboratorio del Departamento de Citohistología de la USAC (31).

1. Protocolo de ensayo hemolítico de actividad sobre la vía clásica del complemento

a) Preparación de suspensión de eritrocitos

- Se mezcló previamente los eritrocitos de carnero con solución Alsever en proporción 1:1
- Se mezclaron 2 ml de los eritrocitos en Alsever con 8 ml de solución salina
- Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min
- Se eliminó el sobrenadante y repitió el lavado 2 veces más
- Tras el último lavado se midieron 200 μ l y se mezclaron con 10 ml de VSB⁺⁺
- Se mezcló 100 μ l de la suspensión anterior con 4.9 ml de VSB⁺⁺
- Se llevó a una concentración de 4×10^8 células/ml.

b) Sensibilización de los eritrocitos de carnero

- Se mezcló 1 ml de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero (diluido 1:100) con 7 ml de VSB⁺⁺ y se añadieron 8 ml de suspensión de eritrocitos, esto se incubó a temperatura ambiente por 10 min.
- Se lavaron los eritrocitos ya sensibilizados tres veces con VSB⁺⁺ y se resuspendió el pellet de células en 16 ml VSB⁺⁺ (en adelante se referirá a dicha suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados como ShEA).
- Se mantuvo la suspensión de eritrocitos en refrigeración hasta su utilización

c) Disposición de la muestra en placa

- Se añadió 100 μ l de muestra en los pozos A1-A9 (la muestra se constituye de una dilución con VSB⁺⁺ del extracto evaluado a una concentración inicial de 500 μ g/ml)
- Se hicieron diluciones sucesivas 1:2 de la muestra en los pozos B a F (50 μ l + 50 μ l VSB⁺⁺), quedando un volumen final de 50 μ l en cada pozo

- d) Preparación de los controles de actividad hemolítica
- Control de la actividad del suero: se añadió 50µl de VSB⁺⁺ a los pozos H1-H3
 - Blanco de suero inactivo: se añadió 50µl de VSB⁺⁺ a los pozos H4-H6
 - 0% de hemólisis: se añadió 100µl de VSB⁺⁺ a los pozos H7-H9
 - 100% de hemólisis: se añadió 100µl de agua destilada a los pozos H10-H12
- e) Preparación del suero y preincubación
- Suero inactivo: se inactivó el suero a 56°C durante 30 min, se realizó la dilución con 63µl del suero inactivo en 5 ml de VSB⁺⁺. Se añadieron 50µl de dicha dilución a los pozos blanco de muestra y H4-H6.
 - Suero activo: se realizó una dilución con 125µl de suero activo en 10 ml VSB⁺⁺. Se añadieron 50µl de dicha dilución a los pozos control y problema .
 - Luego de tapar se preincubó la placa a 37°C por 30 min.
- f) Incubación
- Se añadió 50µl de ShEA a todos los pozos
 - Se incubó a 37°C por una hora
- g) Medición de la hemólisis
- Se centrifugó a 2500 rpm durante 2 min
 - Se añadió 200µl de agua desionizada a cada pozo a utilizar en una placa de fondo plano
 - Se transfirieron 50µl de sobrenadante a los pozos de la placa de fondo plano
 - Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector ELISA

2. Protocolo de ensayo hemolítico de actividad sobre la vía alterna del complemento

- a) Preparación de suspensión de eritrocitos

- Se lavaron 3 veces los eritrocitos de conejo con solución salina
 - Tras el último lavado se resuspendieron 500 μl del pellet en 10 ml de EGTA-VB
 - Se mezclaron 100 μl de la suspensión anterior con 4.9 ml de EGTA-VB
 - Se llevó a una concentración de 4×10^8 células/ml.
 - Se mantuvo la suspensión de eritrocitos en refrigeración hasta ser utilizada
- b) Disposición de la muestra en placa**
- Se añadió 100 μl de muestra en los pozos A1-A9
 - Se hicieron diluciones sucesivas 1:2 de la muestra en los pozos B a F (50 μl + 50 μl EGTA-VB), quedando un volumen final de 50 μl en cada pozo
- c) Preparación de los controles de actividad hemolítica**
- Se añadió 50 μl de EGTA-VB a los pozos H1-H6 (H1-H3 fue el control de la actividad del suero y H4-H6 fue el blanco de suero inactivo)
 - Se añadió 75 μl de EGTA-VB a los pozos H7-H9 (0% de hemólisis)
 - Se añadió 75 μl de agua destilada a los pozos H10-H12 (100% de hemólisis)
- d) Preparación del suero y preincubación**
- Suero inactivo: se inactivó el suero a 56°C durante 30 min, se realizó la dilución con 500 μl del suero inactivo en 500 μl de EGTA-VB. Se añadieron 25 μl de la dilución a los pozos blanco de muestra y H4-H6.
 - Suero activo: se realizó una dilución con 1 ml de suero activo con 1 ml EGTA-VB. Se añadieron 25 μl de dicha dilución a los pozos control y problema.
 - Luego de tapar se preincubó la placa a 37°C por 30 min.
- e) Incubación**
- Se añadió 25 μl de la suspensión de eritrocitos de conejo a cada pozo
 - Se incubó a 37°C por 30 min.

f) Medición de la hemólisis

- Se centrifugó a 2500 rpm durante 2 min
- Se añadió 200µl de agua desionizada a cada pozo de una placa de fondo plano
- Se transfirieron 50µl de sobrenadante a los pozos de la placa de fondo plano
- Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector ELISA

3. Cálculos necesarios

a) Determinación de la actividad sérica expresada como porcentaje de lisis

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

b) Actividad inhibitoria de la muestra vrs. Control

Como ejemplo: para la mayor concentración de la muestra (A1, A2 y A3)

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

c) Determinación de CI₅₀

Se realizó una gráfica de % de inhibición vrs. el Log de concentración, con la recta de regresión obtenida (al menos 4-5 valores significativos) se extrapoló el valor del 50% de inhibición para obtener el CI₅₀.

4. Interpretación de resultados

- a) Positivo (activo): si el extracto aumentó (actividad estimuladora) o disminuyó (actividad inhibitoria) en un 50% la concentración de hemoglobina, comparándolo con el resultado de la actividad sérica; y si la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de

hemólisis CI_{50} fue menor a 15 $\mu\text{g/ml}$.

- b) Negativo (no activo): si la concentración de hemoglobina no se ve alterada por acción del extracto al compararlo con el resultado de la actividad sérica y control negativo; o si la CI_{50} fue mayor a 16 $\mu\text{g/ml}$.

D. DISEÑO ESTADÍSTICO

1. Tipo de estudio

Estudio de tipo experimental. Diseño no probabilístico, por conveniencia. Se determinó la concentración de los extractos etanólicos a la cual se demostró actividad inmunomoduladora sobre el sistema del complemento mediante la evaluación de rangos de concentración, comenzando con 500 $\mu\text{g/ml}$, realizando diluciones seriadas de 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243 y 1:729. El ensayo se realizó por triplicado.

2. Variables de interés

- a) Variable Independiente: Seis plantas medicinales de Guatemala a evaluar.
- b) Variable Dependiente: Actividad inmunomoduladora de los extractos etanólicos de las seis plantas seleccionadas, sobre las vías clásica y alterna del sistema de complemento.

3. Validación del método

El ensayo se validó mediante la realización de una curva que muestra la actividad sérica de la mezcla de suero humano normal utilizado. Se eligió una concentración que demostró una actividad comprendida entre el 30 y el 70%, lo que sirvió de control de la adecuada funcionalidad de todos los componentes del sistema del complemento, presentes en el suero. Se utilizó agua desmineralizada como control positivo (100% de hemólisis), y solución tampón como control negativo (0% de hemólisis). El método se aceptó si se obtenían resultados con un rango de error $\leq 10\%$ en la repetibilidad. Cada ensayo se realizó por triplicado.

4. Análisis de resultados

Un resultado se consideró como positivo si el extracto aumentó (actividad estimuladora) o disminuyó (actividad inhibidora) en un 50% la concentración de hemoglobina, comparándolo con el resultado de la actividad sérica; y si la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de hemólisis CI_{50} fue menor a 15 $\mu\text{g/ml}$.

Un resultado se consideró como negativo si la concentración de hemoglobina no fue alterada por acción del extracto al compararlo con el resultado de la actividad sérica y control negativo; o si la CI_{50} fue mayor a 16 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se utilizó estadística descriptiva en el análisis correspondiente.

VIII. RESULTADOS

A. Actividad inmunomoduladora sobre el sistema de complemento obtenida de los siete extractos etanólicos evaluados

Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro No. 1. La hoja de *Ternstroemia tepezapote* presentó actividad inhibidora de la vía clásica del sistema de complemento y la hoja de *Lippia chiapasensis* presentó actividad inhibidora en ambas vías. Por otra parte, los extractos de *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *Ternstroemia tepezapote*, *Justicia pectoralis* y *Cissampelos tropaeolifolia* no presentaron ninguna actividad sobre el sistema de complemento.

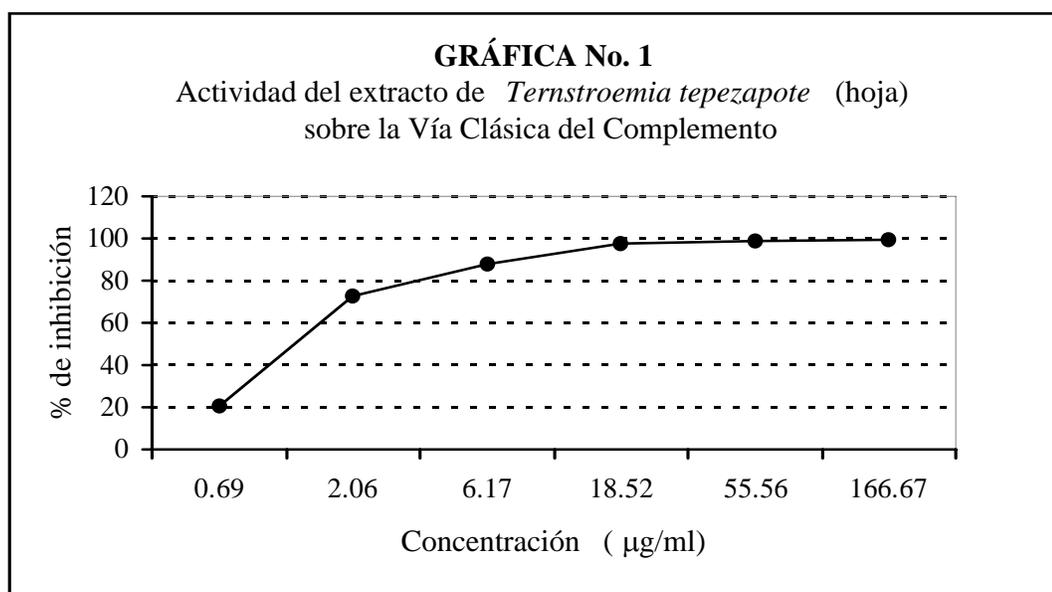
Cuadro No. 1
Actividad moduladora de los extractos evaluados.

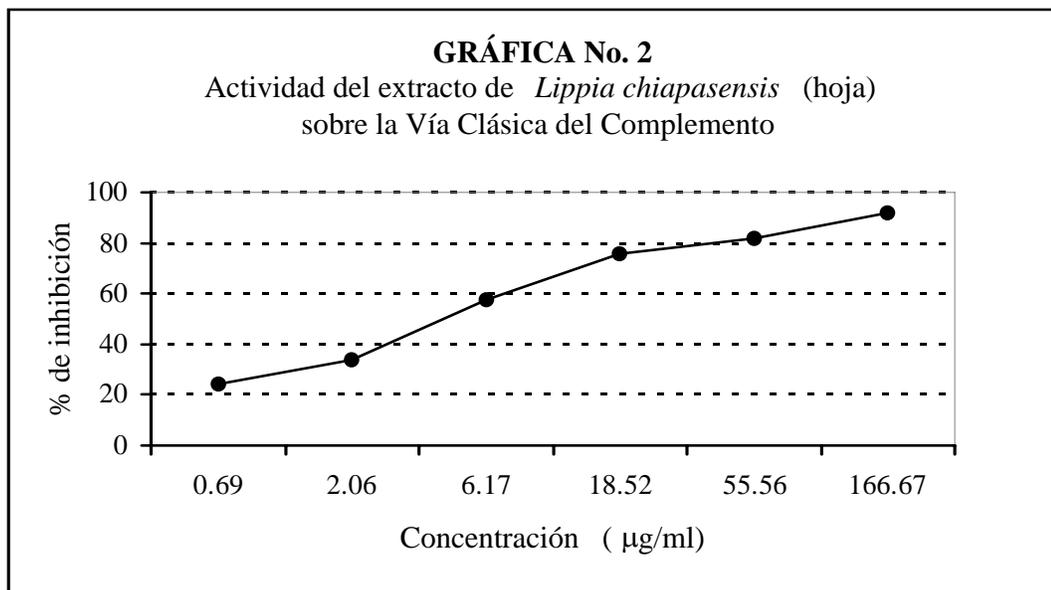
Planta evaluada	Vía Clásica	Vía Alterna
<i>Pimenta dioica</i> (hoja)	No activa	No activa
<i>Piper auritum</i> (hoja)	No activa	No activa
<i>Ternstroemia tepezapote</i> (flor)	No activa	No activa
<i>Ternstroemia tepezapote</i> (hoja)	Actividad inhibidora	No activa
<i>Justicia pectoralis</i> (hoja)	No activa	No activa
<i>Cissampelos tropaeolifolia</i> (hierba)	No activa	No activa
<i>Lippia chiapasensis</i> (hoja)	Actividad inhibidora	Actividad inhibidora

El criterio para considerar la actividad del extracto fue el aumento o disminución en 50% de la concentración de hemoglobina liberada comparado con el resultado obtenido de la actividad del suero y con una concentración del extracto en estudio necesaria para obtener un 50% de hemólisis CI_{50} menor de 15 $\mu\text{g/ml}$.

1. Actividad sobre la Vía Clásica

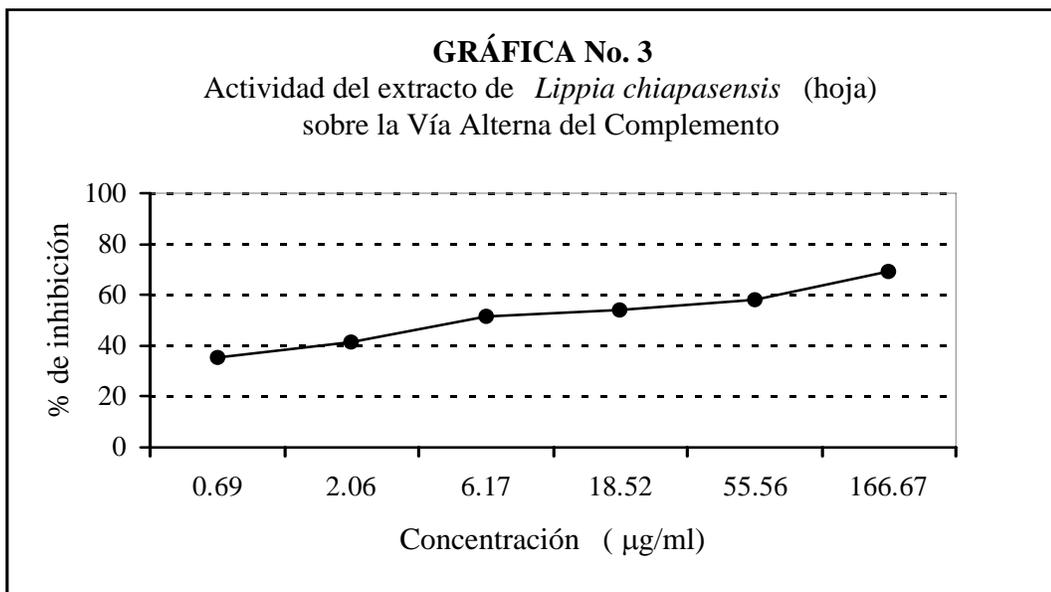
Las gráficas No. 1 y 2 ilustran la actividad inhibitoria sobre el complemento causada por los extractos de la hoja de *Ternstroemia tepezapote* y la hoja de *Lippia chiapasensis*. En ambas puede observarse que existe una correlación positiva entre la concentración y el porcentaje de inhibición (conforme aumenta la concentración también aumenta el porcentaje de inhibición).





2. Actividad sobre la Vía Alterna

La gráfica No. 3 ilustra la actividad inhibitoria sobre el complemento causada por el extracto de la hoja de *Lippia chiapasensis*, pudiéndose observar la misma correlación positiva entre la concentración del extracto y el porcentaje de inhibición de la hemólisis.

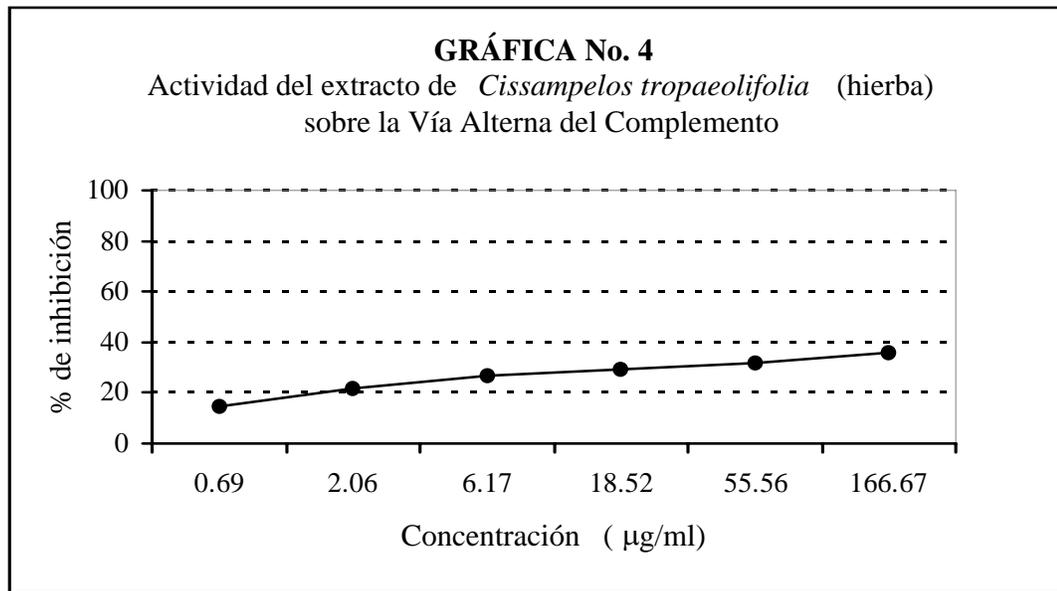


B. Determinación de CI_{50}

El cuadro No. 2 muestra los resultados de CI_{50} de los siete extractos investigados, con los que se determinó su actividad o inactividad. *Cissampelos tropaeolifolia* no produjo lisis eritrocitaria del 50% (gráfica No. 4).

Cuadro No. 2
Valores de CI_{50} obtenidos en las dos vías del Sistema de Complemento

Planta evaluada	Vía Clásica	Vía Alterna
<i>Pimenta dioica</i> (hoja)	78.13 $\mu\text{g/ml}$	114.54 $\mu\text{g/ml}$
<i>Piper auritum</i> (hoja)	69.18 $\mu\text{g/ml}$	60.26 $\mu\text{g/ml}$
<i>Ternstroemia tepezapote</i> (flor)	67.60 $\mu\text{g/ml}$	40.74 $\mu\text{g/ml}$
<i>Ternstroemia tepezapote</i> (hoja)	3.02 $\mu\text{g/ml}$	131.85 $\mu\text{g/ml}$
<i>Justicia pectoralis</i> (hoja)	131.83 $\mu\text{g/ml}$	79.43 $\mu\text{g/ml}$
<i>Cissampelos tropaeolifolia</i> (hierba)	398.11 $\mu\text{g/ml}$	Negativo
<i>Lippia chiapasensis</i> (hoja)	13.99 $\mu\text{g/ml}$	14.45 $\mu\text{g/ml}$



IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal del presente estudio fue determinar si los siete extractos de las seis plantas seleccionadas poseen actividad inmunomoduladora sobre las vías clásica y alterna del sistema de complemento. Los resultados obtenidos muestran que el extracto de hoja de *Ternstroemia tepezapote* presentó actividad inhibitoria de la vía clásica (gráfica No. 1), y de hoja de *Lippia chiapasensis* mostró actividad inhibitoria de ambas vías (gráficas No. 2 y 3).

Los extractos de hoja de *Pimenta dioica*, hoja de *Piper auritum*, flor de *Ternstroemia tepezapote*, hoja de *Justicia pectoralis* y hierba de *Cissampelos tropaeolifolia* no presentaron actividad sobre la vía clásica ni vía alterna del sistema de complemento.

La determinación de la actividad se basó en la concentración de extracto que produjo 50% de inhibición de la hemólisis, considerando una concentración inicial de 15 µg/ml. Esta

se consideró adecuada tomando en cuenta que concentraciones mayores a esta podrían incluir los efectos de sustancias interferentes como bacterias, hongos, polisacáridos, alcaloides y otros (55), así como poco interés en el potencial para desarrollar un fitofármaco. Se asume que los resultados de concentraciones menores o iguales a esta concentración límite, son representativos de la actividad de la planta evaluada. Este criterio es particularmente útil en la evaluación de la vía alterna, pues ésta es susceptible de activación por bajas concentraciones de productos microbianos que podrían producir resultados inespecíficos no deseados.

La actividad anti-complemento observada podría deberse a varias causas, entre las cuales se pueden incluir efectos de interferencia con los componentes C₁, C₂, C₃, C₄ e IgG; a la presencia de agentes quelantes de los cationes divalentes Ca⁺² y Mg⁺², a la presencia de lipopolisacáridos de membrana de bacterias Gram negativo o a la estimulación de reguladores y/o inhibidores de la activación de la vía clásica, entre otros.

Se considera de importancia el hallazgo del efecto inhibitor observado en los extractos de hoja de *Ternstroemia tepezapote* y hoja de *Lippia chiapasensis* porque ninguna de las dos había sido reportada como poseedora de dicha actividad u otra similar en la literatura previa revisada. Tradicionalmente *T. tepezapote* es conocida como tranquilizante y de *L. chiapasensis* no se encontró registro escrito sobre usos terapéuticos tradicionales. Estos resultados dan la pauta para estudios más profundos y especializados para determinar los principios activos presentes en los extractos de estas plantas y proveen vistas prometedoras a su aplicación en el campo de la inmunofarmacología. Estas aplicaciones incluyen el uso como inmunosupresores sobre el sistema de complemento y todo lo que este conlleva, proveer acción anti-inflamatoria y disminuir los efectos de amplificación de la respuesta inmune. Todo esto beneficiaría específicamente a pacientes que padecen enfermedades autoinmunes o de tipo inflamatorio (1, 9-13, 32, 53, 54).

En la actualidad los estudios de etnomedicina cobran importancia y amplían su campo, el conocimiento de las múltiples ventajas del uso de agentes puramente naturales y sin efectos secundarios, en el tratamiento de enfermedades que tradicionalmente han sido tratadas con agentes químicos farmacológicos (los cuales pueden tener efectos indeseados) despierta el

interés en la investigación y abre las posibilidades para el entendimiento y beneficio de los conocimientos tradicionales que se ha transmitido de generación en generación, en comunidades como las del interior de Guatemala, donde lamentablemente han sido menospreciadas por la medicina moderna.

X. CONCLUSIONES

1. Se comprobó la hipótesis que el extracto etanólico de al menos una de las seis plantas nativas de Guatemala evaluadas en el presente estudio posee acción inmunomoduladora sobre el sistema de complemento.
2. Los extractos etanólicos de la hoja de *Ternstroemia tepezapote* y la hoja de *Lippia chiapasensis* poseen actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema de complemento.
3. El extracto etanólico de *Lippia chiapasensis* posee actividad inhibitoria de la vía alterna del sistema de complemento.
4. El extracto etanólico de la hoja de *Lippia chiapasensis* presentó valores de CI_{50} sobre las

vías clásica y alterna del sistema de complemento de 13.99 $\mu\text{g/ml}$ y 14.45 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

5. El extracto etanólico de la hoja de *Ternstroemia tepezapote* presentó un valor de CI_{50} de 3.02 $\mu\text{g/ml}$ sobre la vía clásica del sistema de complemento.
6. El resto de extractos etanólicos evaluados presentaron un valor de CI_{50} mayor a 15 $\mu\text{g/ml}$ sobre las vías clásica y alterna del sistema de complemento.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones para determinar los principios activos presentes en los extractos de hoja de *Ternstroemia tepezapote* y hoja de *Lippia chiapasensis*, que les proveen de la actividad moduladora sobre el sistema de complemento.
2. Continuar con la investigación de otras aplicaciones medicinales de las plantas evaluadas en el presente estudio, pues tradicionalmente se sabe que la mayoría de plantas poseen más de un sólo uso terapéutico.
3. Realizar estudios *in vivo* que comprueben y amplíen los resultados obtenidos en el presente estudio, apoyando la posible aplicación de estos extractos en el manejo y tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

4. Promover la importancia de la investigación de los usos y aplicabilidad de la medicina natural tradicional de Guatemala.
5. Impulsar programas de educación y aprovechamiento sostenible de la flora de Guatemala como fuente de agentes terapéuticos naturales y apoyo a la salud preventiva y curativa de las comunidades.

XII. REFERENCIAS

1. Stites D. Terr A. Inmunología Básica y clínica. 9ª Ed. Mérito A. Trad. México: Manual Moderno, 1998. 1080p
2. Iañez E. Introducción al sistema inmunitario. Disponible en www.upch.edu.pe/facien/microweb/inmuno.htm
3. Inmunología. Disponible en www.es/inmuno.htm
4. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Section 12 Chapter 146, Biology of the Immune System. Estados Unidos de América: Editorial Whitehouse Station, 1995.
5. Liszewski K. Atkinson J. Fundamental Immunology. 3rd Edition. Estados Unidos de América: Raven Press Ltd. 1993. 1235p
6. Sell S. Inmunología e Inmunidad. 2ª Edición. México: Editorial Rala S.A., 1981. 386p
7. Bjerre A. Brusletto B. Mollnes T. Fritzson E. Complement activation induced by

- purified *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharide (LPS), outer membrane vesicles, whole bacteria, and an LPS-free mutant. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;185:220-228.
8. Rosas A. MacGill R. Nosanchuk J. Kozel T. Casadevall A. Activation of the alternative complement by fungal melanins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2002;9:144-148.
 9. Hadden J. Szentivcinyi T. *Immunopharmacology*. Vol. 1. Estados Unidos de América: Editorial Plenum Press, 1990. 418p.
 10. Dean J. Luster H. Munson A. *Agent immunomodulatory, immunotoxicology and immunopharmacology*. Estados Unidos de América: Editorial Raven Press New York, 1985.
 11. Court L. Beckenham M. *Immunomodulators from plants and fungi*. *Phytoterapy Research*. 1988;2:159-164.
 12. Colegar S, Molyneux R. *Bioactive Natural Products*. Estados Unidos de América Editorial CRC Press, Inc., 1993. 317p.
 13. Crisci C. Inmunoterapia e inmunomodulación. Disponible en [www.fmedic.unr.edu.ar/catedras/inmunologia/unidades%20tem%C3%A1ticas%5CINMU NOTERAPIA-INMUNOMODULACION.doc](http://www.fmedic.unr.edu.ar/catedras/inmunologia/unidades%20tem%C3%A1ticas%5CINMU%20NOTERAPIA-INMUNOMODULACION.doc)
 14. Wagner H. Proksch A. *immunostimulatory drugs of fungi and higher plants*. Inglaterra: Editorial Academic Press Inc. 1989. 133p
 15. Hadden J. Szentircinyi T. *Pharmacokinetics of immunomodulators*. *Inmunopharmacology*. 1990;1:418.
 16. Cáceres A. *Plantas de uso medicinal de Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria 1996. 402p
 17. Fitoterapia. Disponible en <http://personal.redestb.es/martín/pfito.htm>
 18. Holmstedt B. *Historical perspective and future of ethnopharmacology*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991;32:7-24.
 19. Mongelli E. Pomilio A. *Nuevos medicamentos y etnomedicina: del uso popular a la industria farmacéutica*. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy*. 2002;12:68
 20. *Etnomedicina*. Disponible en www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy68/medicamentos.htm
 21. *Etnofarmacología*. Disponible en <http://www.un.org>

22. Doel D. Gyllenhaal C. información etnomédica en el descubrimiento y desarrollo farmacéutico. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.
23. Comerford S. Rescate de los conocimientos etnobotánicos de grupos maya-parlantes de comunidades ubicadas a inmediaciones de la reserva de la biosfera maya en el departamento del Petén en Guatemala. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.
24. Campos R. Curanderismo urbano en América Latina. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.
25. Bourgey A. Ensayo de etnofisiología Maya-K’iché. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.
26. 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
27. Martínez J. Las colecciones de campo de plantas medicinales, su utilidad en investigación y en la promoción de conocimientos. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.
28. Osorio A. Tamizaje de la actividad inmunomoduladora del sistema del complemento por extractos de cinco plantas medicinales usadas en el tratamiento de infecciones protozoarias intracelulares: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. 62p
29. Castillo C. Actividad moduladora del sistema del complemento de cinco plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de infecciones protozoarias intracelulares: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. 54p.
30. Alvarez E. Actividad inmunomoduladora de rizoma y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanun*: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. 62p
31. Klerx Bukelma Vadijk & Willers. Microscopy for colorimetric estimation of complement activity in Guinea pigs, human and mouse serum. *Journal of Immunological Methods*. 1983;63:215-220.

32. Standley P. Louis William. Flora de Guatemala. Estados Unidos de América: Botany Publishes by Field Museum of Natural History. 1996. 432p
33. Pérez G. Rivero R. Pardo Z. Rodríguez J. Evaluación de la actividad antioxidante de *Justicia pectoralis*. Revista Cubana Invest Biomed. 2001;20(1):30-33
34. *Justicia pectoralis*. Disponible en <http://www.ho-tinursery.com/amazon.html#Justicia%20pectoralis>
35. MacRae W.D. Towers G.H. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as a hallucinogenic snuff ingredient. Journal of Ethnopharmacology. 1984;12(1):93-111.
36. *Justicia pectoralis*. Disponible en <http://amazonas.rds.org.co/libros/28/28000007.HTM#15>
37. Benitez A. Tillán J. Cabrera Y. Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de *Pimenta dioica* L. Y evaluación de su toxicidad aguda oral. Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol32_3_98/far09398.htm
38. Al-Rehally A. Al-Said M. Al-Yahya M. Mossa J. Rfatullah S. Ethnopharmacological studies on allspice (*Pimenta dioica*) in laboratory animals. Pharmaceutical Biology. 2002;40(3):200-205.
39. Allspice/Pimento essential ail information in aromatherapy. Disponible en http://www.essentialoils.co.za/essential_oils/allspice.htm
40. Macía M. La pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merril, Myrtaceae) en la sierra norte de Puebla (México). Disponible en [http://www.rjb.csic.es/publicaciones/anales/vol_56\(2\)/vol56\(2\)_abstract_9.htm](http://www.rjb.csic.es/publicaciones/anales/vol_56(2)/vol56(2)_abstract_9.htm)
41. Suárez A. Ulate G. Ciccio J. Hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* (Myrtaceae) in rats. Disponible en <http://rbt.ots.ac.cr/revistas/48-1/botsuare.htm>
42. Familia: Myrtaceae. Disponible en http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/pimenta_dioica.htm
43. Villar A. Ortega T. Carretero M. Pascual E. Investigación de la actividad antiinflamatoria en extractos etanólicos de plantas. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.
44. Marroquín N. Sagastume A.M. Vásquez T.C. Saravia A. Actividad analgésica de plantas medicinales de uso popular en Guatemala. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.

45. Morón F. Martínez M.C. Furones J. García A. Pinedo A. Validación farmacológica del efecto espasmolítico de varias plantas utilizadas tradicionalmente para trastornos digestivos en Cuba. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Alessandro Malaspina”. Guatemala: 1997.
46. Gracia A.J. Martínez M.C. Morón F. Actividad antiespasmódica de extractos de *Piper auritum* en intestino. Rev. Cubana Plant Med. 2001;1:19-22.
47. Gracia A.J. Martínez M.C. Morón F. Efecto espasmolítico del aceite de *Piper auritum* en el músculo liso intestinal. Rev. Cubana Plant Med. 2001;12:5-13.
48. *Piper auritum*. Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol6_1_01/pla03101.pdf
49. Eared pepper. Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol6_1_01/pla05101.pdf
50. *Piper auritum*. Disponible en www.hear.org/pier/piaur.htm
51. Familia: Piperaceae. Disponible en www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/piper_auritum.htm
52. Trelease. W. The Piperaceae of Northern South America. University of Illinois Press, Urbana. 1950, 133-134p
53. Kangas P. C. Forgotten Fruits: The Role of Abandoned Home Gardens in a Belizean Riparian Forest. Disponible en http://www.erowid.org/plants/virola/references/journal/1984_macrae_ethnopharm_1_abstr_act.shtml
54. Calderón A. Gupta M. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of Panama. Economic Botany. 2000;54(3):278-294.
55. Simons J.M. Immunomodulatory compounds from *Pichorhiza kurroa* isolation and characterization of two anti-complementary polymeric fraction from an aqueous root extract. Journal of ethnopharmacology. 1989; 26: 169-182.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1:

REACTIVOS

- Solución Stock VSB⁰: disolver 41.5 g (0.71 M) de NaCl y 5.1 g (24.76 mmol) de barbital sódico (Veronal) en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.35 y enrasar hasta 1 litro.
- Solución Stock de Ca/Mg: disolver 10.17 g (50 mmol) de MgCl₂.6H₂O y 2.21 g (15 mmol) CaCl₂.2H₂O en 100 ml de agua destilada.
- Solución Stock de etilenglicol-bis[b-aminoetileter-N,N,N',N'-ácido tetracético] (EGTA): disolver 7.6 g (20 mmol) EGTA en 200 ml de agua destilada en presencia de NaOH, ajustar el pH a 7.35 y añadir 3.075 g (12.4 mmol) de MgSO₄.7H₂O, enrasar a 1 litro.
- Solución tampón de barbital sódico (VSB⁺⁺): mezclar 200 ml de solución stock de VSB

con 1 ml de solución stock de Ca/Mg, enrasar hasta 1 litro con agua destilada. El pH debe ser de 7.35.

- Solución tampón EGTA-VB: mezclar 200 ml de solución stock de VSB con 40 ml de la solución stock de EGTA, enrasar hasta 1 litro con agua destilada. El pH debe ser de 7.35.
- Solución Alsever: disolver 20.5 g (114 mM) de glucosa, 7.9 g (27 mM) de citrato de sodio dihidratado y 4.2 g (71 mM) de NaCl en 50 ml de agua destilada, enrasar a 1 litro y ajustar el pH a 6.1 usando ácido cítrico 1M. Filtrar con filtro de poro 0.22 μ m. Almacenar indefinidamente a 4°C.
- Solución salina: disolver 9 g de NaCl en un litro de agua destilada.