

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

**“Actividad inmunomoduladora de hojas de *Cornutia pyramidata*
L. y *Cornutia grandifolia* Shauer in DC”**

Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

Química Bióloga

Guatemala, mayo 2009

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

**“Actividad inmunomoduladora de hojas de *Cornutia pyramidata*
L. y *Cornutia grandifolia* Shauer in DC”**

INFORME DE TESIS

Presentado por

Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

Para optar al título de
Química Bióloga

Guatemala, mayo 2009

JUNTA DIRECTIVA

Óscar Cobar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, MA.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Aníbal Rodrigo Sevillanos Cambronero	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

Este acto está dedicado a Dios por ser mi guía y fortaleza, por darme la dicha de tener unos padres y hermanos maravillosos que me han brindado todo su amor y apoyo en todo momento, por poner en mi camino a personas increíbles que me han ayudado y brindado sus conocimientos durante mi carrera.

AGRADECIMIENTOS A:

- A mis padres, Mario y Crucita por darme todo su amor y apoyo durante toda mi vida, los quiero mucho.
- A mis hermanos, Mario y Cruz por su comprensión, consejos y por estar siempre conmigo.
- A mis amigos, en especial a Ana Beatriz, Ana Margarita, Tatiana, Flor, Isabel, Rebeca, Pedro Pablo , Stephany, Kristel, Vinicio, Ligia, Dayrin, Juan Pablo, Víctor, Ana y Doña Blanqui, por ser una luz en mi camino.
- A mis amigos Rolando y Alejandro por su apoyo indispensable para la realización de este trabajo.
- A mis compañeros de MUPLAM, Nathalia, Christian, Jennifer y Diana.
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala por ser mi casa de estudios.
- A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en especial al departamento de Citohistología, en el cual he aprendido a superarme en varios aspectos de mi vida.
- A mis asesores, Lic. Armando Cáceres y MA. Margarita Paz por compartirme sus conocimientos.
- A mis revisores, MA. María Eugenia Paredes y MSc. Alba Marina Valdés de García por toda su colaboración.
- A mis amigas de toda la vida Arely, Daniela y Margarita.
- A todos mis compañeros de promoción por todos los momentos inolvidables vividos.

INDICE

I.	RESUMEN	02
II.	INTRODUCCIÓN	03
III.	ANTECEDENTES	04
	A. Respuesta Inmune	04
	B. Complemento	05
	C. Linfocitos	08
	D. Inmunomodulación	10
	E. Medicina tradicional	11
IV.	JUSTIFICACIÓN	15
V.	OBJETIVOS	16
VI.	HIPÓTESIS	17
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
	A. Universo y muestra	18
	B. Recursos humanos	18
	C. Recursos institucionales	18
	D. Materiales	19
	E. Metodología	21
	F. Diseño estadístico	27
VIII.	RESULTADOS	30
	A. Selección de plantas y obtención de extractos etanólicos	30
	B. Evaluación de la actividad linfoproliferativa	30
	C. Evaluación de la actividad sobre el complemento vía clásica	31
	D. Evaluación de la actividad sobre el complemento vía alterna	32
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
X.	CONCLUSIONES	36
XI.	RECOMENDACIONES	37
XII.	REFERENCIAS	38
XIII.	ANEXOS	42

I. RESUMEN

El sistema inmune tiene como función distinguir lo propio de lo extraño y proteger al organismo contra agentes infecciosos mediante diversos mecanismos, algunos no específicos (respuesta innata) y otros específicos (respuesta específica). Así mismo, todos estos mecanismos de defensa se encuentran coordinados y regulados, y cuando esta regulación falla se produce un desorden en el sistema inmunitario desencadenando enfermedades autoinmunes.

En el presente estudio se evaluó la actividad inmunomoduladora *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Cornutia pyramidata* L. y *Cornutia grandifolia* (Schlecht. & Cham.) Shauer in DC sobre la vía clásica y alterna del sistema de complemento y sobre la población de linfocitos. Para la evaluación del complemento, se realizó un ensayo hemolítico y se obtuvo sobre la vía clásica, una concentración inhibitoria mínima de *C. pyramidata* a 166.67 $\mu\text{g/mL}$ y en *C. grandifolia* una concentración inhibitoria mínima de 500 $\mu\text{g/mL}$. Para la actividad sobre la vía alterna, únicamente *C. pyramidata* presentó una concentración inhibitoria mínima a 55.56 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$).

Para la evaluación de la actividad de los extractos sobre la población de los linfocitos se realizó un cultivo de linfocitos los cuales fueron retados a diferentes concentraciones de extracto y se encontró que el extracto de *C. grandifolia* a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ fue el único que presentó una actividad inhibitoria de la linfoproliferación entre 31 y 100% ($p < 0.05$).

Los resultados fueron evaluados mediante ANOVA con la prueba de Tukey y un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). Así mismo, la comparación entre las dos especies de *Cornutia* se realizó mediante una prueba de hipótesis binomial a 95% de confianza ($p < 0.05$).

La demostración de la actividad inhibitoria sobre la actividad del sistema de complemento y/o sobre los linfocitos encontrada en las especies de *Cornutia*, comprueba la hipótesis de este estudio y avala su uso popular como un antiinflamatorio.

II. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el conjunto de órganos que producen células y moléculas que nos protegen contra microorganismos y sustancias extrañas, mediante el cual se produce un estado de resistencia con la presencia de anticuerpos, células o sistemas moleculares que poseen una acción específica. Entre los sistemas moleculares se encuentra el complemento, el cual es un grupo de más de 20 proteínas plasmáticas y de membrana que actúan en las vías clásica, alterna y de las lectinas. Estas vías proceden por medio de activación secuencial en donde la vía clásica se activa cuando el complejo antígeno-anticuerpo se une y activa a C1q en presencia de calcio. La vía alterna se activa por la presencia de microorganismos en ausencia de calcio y la vía de las lectinas se activa por medio de una proteína de unión a manosa.

Los linfocitos son las células inmunes predominantes en una respuesta inmune específica. Se dividen en B (CD19, CD20), T (CD4, CD8) y NK (CD16) de acuerdo a los marcadores de superficie celular, el origen embrionario y actividad inmunológica.

El tratamiento de distintas enfermedades inmunológicas ha llevado a la búsqueda de nuevos componentes inmunomoduladores y es aquí donde las plantas medicinales juegan un papel importante como fuente principal de sustancias activas. A partir de 2002 se han realizado varios estudios en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala con plantas medicinales para determinar su potencial como fuente de compuestos con acción sobre la respuesta inmune.

El presente estudio evaluó el efecto inmunomodulador *in vitro* sobre el sistema de complemento (por medio de un ensayo hemolítico) y la linfoproliferación (a través de un ensayo linfoproliferativo basado en la reducción de la sal de tetrazolio XTT) de extractos etanólicos de las hojas de *Cornutia pyramidata* L. (jorobté) y *Cornutia grandifolia* (Schlecht. & Cham.) Shauer in DC (cucaracha), ya que ambas son utilizadas popularmente para el tratamiento contra gastritis, asma, rabia e inflamaciones autoinmunes. El tipo de estudio empleado fue cuasi-experimental con 5 réplicas cada ensayo y el análisis de datos se realizó por medio de un ANOVA al 95% de confianza y la comparación de poblaciones se realizó con una prueba de hipótesis binomial al 95% de confianza.

III. ANTECEDENTES

A. Respuesta inmune

La función del sistema inmune es distinguir lo propio de lo extraño y proteger el organismo de esto último (1, 2). La respuesta inmunitaria está estructurada por una secuencia compleja de eventos; se inicia con la presencia de un estímulo (inmunógeno) y por lo general, culmina con la eliminación del agente que la provoca. Esta respuesta depende principalmente de tres tipos celulares: macrófagos, linfocitos T y linfocitos B. Aparte de esto, el sistema inmunitario está conectado de manera integral con el complemento, cininas, coagulación y sistemas fibrinolíticos, todos los cuales participan en la inflamación. Hay dos niveles de defensa contra la invasión por los agentes externos: la inmunidad innata y la adaptativa o adquirida (3).

1. Inmunidad innata

Este mecanismo es la primera línea de defensa desde el nacimiento. Incluye barreras epiteliales, mucosas, proteínas solubles (proteínas del complemento, citoquinas, quimiocinas, enzimas) y células inflamatorias (macrófagos, polimorfonucleares, NK, eosinófilos) (2, 3, 4).

2. Inmunidad adaptativa

Se inicia con la presencia de un agente extraño que escapa a la eliminación temprana por el sistema inmunitario innato y se produce una respuesta específica contra cada agente (2, 3). Se manifiestan dos de las armas principales de la respuesta inmune: la inmunidad celular (linfocitos B con producción de anticuerpos) y la inmunidad celular (linfocitos T) (4). Así, este sistema crea una memoria inmunológica específica, lo que se demuestra en una respuesta intensificada en una reexposición (2, 4).

Estos dos tipos de inmunidad actúan en una forma conjunta para la completa y efectiva respuesta inmune (2).

B. Complemento

Es un grupo de proteínas del plasma y de la membrana celular que actúan al menos de tres maneras principales: provocar y dirigir la lisis celular, bacteriana y virus recubiertos; mediar el proceso de opsonización facilitando la fagocitosis, y generar fragmentos peptídicos que regulan las características de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. El complemento puede ser activado por medio de tres vías: clásica, alterna y de las lectinas (3,5).

Estas vías proceden por medio de activación secuencial y ensamblan una serie de 20 glucoproteínas, en donde C3 es común para todas las vías (3,5).

1. Vía clásica

Las proteínas de la vía clásica se denominan C1-C9 en el orden secuencial C1,4,2,3,5,6,7,8,9. El complejo macromolecular C1 está conformado por tres proteínas (C1q, C1r y C1s) y el resto los componentes del complemento, por la acción de proteinasas, divide cada uno en dos partes (a y b) generando productos de fusión y de fisión (3, 6). Esta vía se inicia cuando el inmunocomplejo formado por IgG o IgM se une a C1q y lo activa en presencia del ion calcio (3).

2. Vía alterna

Los componentes de la vía alterna colaboran para producir varias respuestas inmunes, tales como fagocitosis e inflamación, a través de la activación de C3 (6). C3 en presencia de magnesio, puede interactuar con otra proteína circulante, el factor B de la vía alterna (análogo a C2), y en presencia del factor D continúa la activación de la vía alterna. La properdina, proteína plasmática, se une a la convertasa de la vía alterna y la estabiliza, disminuyendo su velocidad de decaimiento y permitiendo

continuar con la cascada del complemento. Esta vía es activada por la presencia de polisacáridos (3,6).

3. Vía de las lectinas

Es una especie de variante de la ruta clásica, que se activa sin la necesidad de la presencia de anticuerpos. La activación se lleva a cabo por medio de una proteína de unión a manosa (PUM o MBP Manose Binding Protein). Se trata de un componente parecido estructuralmente al C1q: hexámero con 18 cadenas polipeptídicas idénticas enrolladas de tres en tres. Los hexámeros de PUM se pueden unir con dos unidades de C1r y dos de C1s, pero parece que va acompañada de su propia serín-proteasa (denominada MASP), que muestra casi 40% de homología con C1r o C1s (5,7).

La PUM se une preferentemente a los extremos de manosa, fucosa y glucosamina de polisacáridos o glucoproteínas de membrana de gran variedad de bacterias. De modo similar a lo que ocurre con el complejo C1, cuando la PUM se une con esos carbohidratos, sufre un cambio conformacional que a su vez activa a su proteína asociada a la PUM (MASP-1, MASP-2 y MASP-3). Una vez activada, la MASP actúa secuencialmente sobre C4 y C2, para producir una C3-convertasa de la ruta clásica (5,7,8).

4. Mecanismos de control

a) *Inhibidor de C1*

El inhibidor de C1 (C1Inh) reconoce el C1r y C1s activados y destruye su actividad. Así, regula las enzimas formadas durante la activación del sistema generador de cininas, sistema de aglutinación y fibrinolítico (3).

b) *Proteína captadora de C4, Factor I y Factor H*

La proteína captadora de C4 (C4BP) y una segunda proteína, el Factor I, son responsables de la regulación de C4b. El factor I es también responsable de la ruptura de C3b y en este caso se requiere del Factor H (3).

c) *Vitronectina (proteína S)*

La vitronectina (VN) es una proteína adhesiva presente en el plasma relacionada con la homeostasis al regular la coagulación y fibrinólisis. Es estabilizadora del activador tisular del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y tiene un efecto antitrombótico al inhibir la agregación plaquetaria (9).

d) *Receptores de C3* tales como CR1 (eritrocitos, granulocitos, fagocitos mononucleares y linfocitos B), CR2 (células linfoblastoides y linfocitos B) y CR3 (células fagocíticas) (3).

e) *El factor de aceleración del decaimiento (DAF)* es una proteína aceleradora del decaimiento de la C3 convertasa (3).

f) *Factor de restricción homólogo (HRF)* o proteína captadora de C8 que actúa para prevenir la inserción completa y exitosa del MAC (C5b-9). Actúa para prevenir la lisis celular en otro paso de la cascada del complemento (3).

g) *Proteína cofactor de membrana (MCP)* la cual facilita la ruptura de C3b e iC3b por el factor I (3).

5. Pruebas para la valoración del complemento

a) *Ensayos hemolíticos*

Los ensayos hemolíticos dependen de la formación del MAC (complejo de ataque a la membrana) en la superficie de los eritrocitos, en donde el MAC desestabiliza y lisa la membrana celular, liberándose hemoglobina, la cual es medida y utilizada como parámetro de la actividad del complemento (3, 10).

La vía clásica se mide mediante la CH_{50} y la alterna mediante AH_{50} (10).

i) La CH_{50} es una unidad arbitraria definida como la cantidad de complemento que se necesita para provocar la lisis del 50% de eritrocitos. Se emplean eritrocitos de carnero (E), anticuerpo de conejo contra eritrocitos de carnero (A) y suero fresco como fuente de complemento (C). La concentración de hemoglobina proveniente de las células lisadas es medida

espectofotométricamente. Un resultado bajo (entre 20-50%) a menudo indica un consumo elevado o un déficit de alguna proteína reguladora del complemento (Factor H o I).

- ii) La AH_{50} es un método similar a CH_{50} y se basa igualmente en la medición espectofotométrica de la hemoglobina liberada por la lisis de eritrocitos de conejo. En este método, la activación de la vía clásica dependiente de calcio se previene utilizando EGTA (ácido etilenglicol tetraacético).

Para la evaluación de lectinas se detectan los niveles en suero de la proteína de unión a manosa y se basa en la lisis de eritrocitos de pollo inducida por levaduras (8).

b) *Fijación del complemento*

Esta prueba depende de 2 etapas. En la etapa inicial, antígeno y anticuerpo reaccionan en una cantidad de complemento y éste se consume (fija). En la segunda etapa, se mide la actividad hemolítica del complemento fijado, y de esta forma, la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la mezcla inicial. La cantidad de actividad que permanece después de la reacción inicial se titula y los resultados se expresan como la mayor dilución sérica que presente fijación (3).

c) *Inmunoanálisis*

Los anticuerpos se pueden preparar contra la mayor parte de los componentes mayores del complemento y sus inhibidores. Las técnicas que se han utilizado son electroinmunodifusión, difusión radial simple y nefelometría de tasa (3).

C. Linfocitos

Los linfocitos son los inmunocitos predominantes y están presentes en una respuesta inmune específica. De acuerdo a la expresión de marcadores de superficie celular, se han identificado tres líneas de linfocitos: linfocitos T, linfocitos B y asesinas naturales (NK) (3).

1. Linfocitos T

Son células que nacen de la maduración de células germinales del timo e inician la respuesta inmunitaria, median las respuestas efectoras antígeno-anticuerpo y regulan la actividad de otros leucocitos (3).

De acuerdo a la expresión de los antígenos de membrana, los linfocitos T maduros se dividen en:

a) *Células T supresoras-citotóxicas (Tc/s)*

Tienen el marcador $CD4^+8^+$ en su membrana, median la mayoría de la citotoxicidad específica para el antígeno y pueden suprimir las respuestas inmunitarias. Reconocen a los antígenos por medio de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I liberan las linfoquinas IL-2 e interferón gamma ($INF-\gamma$) (3).

b) *Células T colaboradoras/inductoras (Th)*

Tienen el marcador $CD4^+8^-$. Tiene la capacidad de incrementar respuestas de células B y amplificar las respuestas de las células Tc/s. Reconocen a los antígenos por medio del receptor de células T (TCR) al MHC clase II. También secretan factores solubles que influyen las funciones efectoras mediadas por otros leucocitos (3, 11).

2. Linfocitos B

Expresan inmunoglobulinas (Ig) en la membrana. La Ig es la responsable de captar el antígeno, la activación celular subsecuente y la secreción de Ig soluble en suero y tejidos. Se dividen en IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgE, IgD (3, 4).

3. Asesinas naturales (NK)

Su función más importante es defender al organismo contra infecciones virales, intracelulares y tumores. Su citotoxicidad no es restringida por MHC y no poseen especificidad por el antígeno ni adquieren memoria inmunológica (3).

4. Métodos para determinar actividad linfoproliferativa *in vitro*

- a) El método estándar para la medición de actividad linfoproliferativa es la incorporación de timidina tritiada en cultivos de células mononucleares de sangre periférica. Se fundamenta en que las células en proceso proliferativo inducido por mitógenos, incorporan la timidina marcada radioactivamente con tritio (^3H) como base para la síntesis de nuevo ADN; por lo tanto se estima el número de células que están proliferando. El nivel de proliferación se evalúa en función del nivel de radioactividad alcanzado por las células en cultivo (12, 13).
- b) Gaines y col. desarrollaron un nuevo método utilizando sangre completa y citometría de flujo para la identificación de linfoblastos con replicación de ADN, los cuales pueden ser tipificados por inmunofluorescencia triple (13).
- c) El uso de sales de tetrazolio se basan en el hecho que las células vivas transforman la sal de tetrazolio de color amarillo en componentes coloreados azules por parte de las células mitocondriales activas. El producto se mide espectrofotométricamente. Entre ellas se encuentran la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la sal 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H (XTT), las cuales se reducen a cristales de formazán y formazán soluble en agua respectivamente (12, 14, 15, 16).

D. Inmunomodulación

Es el cambio en el sistema inmunitario del cuerpo causado por sustancias que activan o debilitan su función (17). La modulación del sistema inmune incluye inducción, expresión, amplificación o inhibición de las fases aferentes, centrales o eferentes de la respuesta inmune (4). Se han identificado varios tipos de inmunomoduladores, entre ellos $\text{INF}\gamma$, factor estimulante de la colonia de granulocitos, factor estimulante de la colonia de granulocitos y monocitos y sustancias purificadas de microorganismos.

En recientes décadas, polisacáridos aislados de hongos, algas, líquenes y plantas superiores exhiben un gran número de propiedades terapéuticas, modulando el sistema innato y adquirido debido a sus propiedades terapéuticas y su baja toxicidad (18, 19). Se han realizado varios estudios evaluando la actividad inmunomoduladora de plantas medicinales. Classen y col. evaluaron los efectos inmunomoduladores de proteínas arabinogalactánicas de *Baptisia* y *Echinacea*, observando una estimulación sobre los macrófagos y activación de linfocitos B (20). Rininger y colaboradores evaluaron la actividad inmunoestimuladora, antiinflamatoria y antioxidante de *Echinacea* en macrófagos murinos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), reportando una estimulación del sistema inmune innato con la activación de macrófagos y aumentando la viabilidad de las PBMC (21). Castillo evaluó la actividad moduladora sobre el complemento de cinco plantas, de las cuales *Dorstenia contrajerva*, *Phlebodium aureum* y *Simarouba glauca* presentaron actividad inhibitoria sobre la vía clásica del complemento (22). Alvarez evaluó la actividad inmunomoduladora de rizoma y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanum* obteniendo actividad inhibitoria de ambos extractos sobre la vía clásica del complemento y linfoproliferación *in vitro* (23).

E. Medicina tradicional

La medicina tradicional y popular hace uso principalmente de plantas y el uso de la fitoterapia en los países pobres constituye un recurso ancestral fuertemente enraizado en sus costumbres culturales. Así, la Etnofarmacología es la ciencia que realiza el estudio crítico y la evolución de las medicinas nativas y Etnobotánica la ciencia que estudia el uso popular de la flora de una región particular (24, 25, 26). Guatemala es un país privilegiado por la diversidad genética derivada de su ubicación geográfica y la riqueza cultural heredada (25). Debido a esto, se cuenta con una amplia gama de plantas medicinales popularmente usadas, entre ellas las dos plantas del presente estudio:

1. *Cornutia pyramidata* L. (27, 28)

- a) Familia: Verbenaceae.
- b) Nombre común: Flor lila, cucaracha, hoja de zope, lat-ché (Guatemala), tzultesnuk, matasano (Honduras), Bwa kasav (República Dominicana)
- c) Distribución: Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez, Zacapa. México, Honduras, El Salvador, Nicaragua y la cuenca del Caribe.
- d) Descripción botánica: Arbusto alto de hasta 12 m. El tronco llega a medir 15 cm de diámetro. Hojas pubescentes, ovaladas o elípticas, de 4-20 cm de largo y 4-14 cm de ancho, margen entero. Panículas piramidales, terminales, de 10 a 40 cm de largo; flores azules o púrpuras terminales o subterminales, numerosas de 10 a 12 cm de largo. Drupa azulada o negra, esférica y puberulenta de 3 a 6 mm de diámetro.
- e) Usos medicinales: Gastritis, fiebre, asma, dolores corporales y crisis nerviosa.

2. *Cornutia grandifolia* (Schlecht. & Cham.) Shauer in DC (28, 29, 30)

- a) Familia: Verbenaceae
- b) Nombre común: Jorobté, joro'kté, oromté, sak'i'ka, palo cuadrado
- c) Distribución: Alta Verapaz, Guatemala, Izabal, Sacatepéquez. México, Honduras y Panamá.
- d) Descripción botánica: Árbol o arbusto de 5 m de alto. Hojas con pecíolos de 1-5 cm de largo; láminas ovadas a elípticas de 7-30 cm de largo y 5-19 de ancho. Flores azules o púrpuras numerosas. Fruto en forma de cono aplanado a veces copular o globoso de 3-5 mm de largo.
- e) Usos medicinales: Antirrábico, fiebre, dolor de riñones, infecciones de estómago y garganta.

Se han realizado varios ensayos evaluando la actividad biológica de distintos extractos de *C. grandifolia*. Rahalison y col. evaluaron la actividad antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* y contra *Candida albicans* de extractos metanólicos, acuosos y clorofórmicos, reportándose inactividad o actividad débil (31). Se evaluó la actividad de extractos acuosos contra *Biomphalaria glabrata*, reportando inactividad (32). Matsuse utilizó extractos acuosos para evaluar actividad citotóxica y capacidad de inhibición de células gigantes, reportándose una actividad débil en ambos casos (33).

Para la actividad de *C. pyramidata*, Molina evaluó su actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa reportándose actividad positiva contra *A. flavus* (35).

Cabe señalar que en la Flora de Guatemala el género *Cornutia* se divide en dos especies, *C. pyramidata* y *C. grandifolia*, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, en la Flora de Nicaragua, ambas especies se clasifican como una misma especie, *C. pyramidata* (36):

- a) Familia: Verbenaceae
- b) Sinónimos: *C. grandifolia* (Schltdl. & Cham.) Shauer, *C. grandifolia* var. *intermedia* Moldenke, *C. grandifolia* var. *normalis* (Kuntze) Moldenke, *C. grandifolia* var. *quadrangularis* Moldenke, *C. grandifolia* var. *storkii* Moldenke, *C. latifolia* (Kunth) Moldenke, *C. lilacina* Moldenke, *C. lilacina* var. *velutina* Moldenke, *C. pyramidata* var. *isthmica* Moldenke.
- c) Descripción botánica: Árboles o arbustos, 2-10 m de alto, ramas cuadrangulares y cuando jóvenes densamente pubescentes. Hojas opuestas, simples, generalmente ovadas o ampliamente elípticas, 8-28 cm de largo (incluyendo el pecíolo) y 4.5-15 cm de ancho; ápice agudo o acuminado; base largamente decurrente sobre el pecíolo; margen entero a levemente dentado, densamente pubescente, punteado-glandular. Inflorescencia en panículas piramidales de 11-25 (hasta 40) cm de largo y 4-12 (hasta 16) cm

de ancho, mayormente Terminal, brácteas inconspicuas; flores heterostilas; cáliz cuculiforme (pateliforme en el fruto), 1.5-3 mm de largo, ápice entero o dentado con los dientes poco profundos; corola hipocrateriforme, curvada o recta, azul o morada, tubo de 7-11 mm de largo y 2-4 mm de ancho en el ápice, labiado (labio superior con 3 lobos sublinguales de 2-4 mm de largo, lóbulo inferior con un solo lóbulo grande de 3-7 mm de largo); 2 estambres fértiles, exertos y de 4-6 mm de largo en las formas de estilo corto en la boca de la corola y de 2-3 mm de largo en las formas de estilo largo. Posee 2 estaminoideos incluidos de estilo de 5-8 mm de largo en las formas de estilo corto e incluido y de 10-13 mm de largo en las formas de estilo largo y exerto; estigma pequeño desigualmente bilobulado. Fruto drupáceo subgloboso de 0.4-0.7 mm de diámetro con exocarpo carnoso y endocarpo duro, color azul, morado o negro, pireno con 4 semillas. Florece en los meses de enero a agosto con frutos de julio a noviembre.

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país privilegiado por la diversidad genética derivada de su ubicación geográfica y la riqueza cultural heredada de sus antepasados. En la actualidad a pesar del gran desarrollo de las industrias farmacéuticas, las plantas continúan siendo un valioso arsenal de sustancias biológicamente activas y precursores en la elaboración de medicamentos. Se demuestran efectos inmunológicos muy intensos en un número cada vez mayor de plantas medicinales, algunas de ellas actúan estimulando la respuesta inmune, pero la mayoría pueden considerarse como reguladoras.

C. pyramidata y *C. grandifolia* son plantas que crecen en varias regiones de Guatemala y otros países de Centro América. La Flora de Guatemala las clasifica como dos especies diferentes, sin embargo, según la Flora de Nicaragua, corresponden a una misma especie, siendo *C. grandifolia* una sinonimia de *C. pyramidata*. Se les atribuyen propiedades antirrábicas y en menor medida anticancerígenas; también son utilizadas para el tratamiento de gastritis, fiebre, asma, inflamaciones y dolores corporales. La decocción de la raíz se emplea en crisis nerviosa. Los usos populares anteriormente mencionados ponen en evidencia la necesidad de demostrar sus propiedades farmacológicas, particularmente sus propiedades inmunomoduladoras, por lo que en el presente estudio se pretende evaluar el efecto del extracto etanólico de las hojas de ambas especies sobre el sistema de complemento y células linfocíticas y evaluar si existen diferencias en las propiedades biológicas *in vitro* de las mismas.

V. OBJETIVOS

A. General

Evaluar el efecto inmunomodulador *in vitro* de extractos etanólicos de hojas de *C. pyramidata* y *C. grandifolia* sobre el sistema de complemento y sobre la linfoproliferación.

B. Específicos

1. Demostrar la actividad inmunomoduladora de extractos etanólicos de *C. pyramidata* y *C. grandifolia*.
2. Evaluar el efecto hemolítico de los extractos de hojas de dos especies de *Cornutia* sobre la vía clásica del complemento.
3. Demostrar la actividad hemolítica de la vía alterna del complemento y el efecto inmunomodulador en linfocitos de los extractos de las especies de *Cornutia*.
4. Determinar la concentración a la que los extractos de las plantas presentan efecto inmunomodulador.
5. Comparar la actividad inmunomoduladora de cada uno de los extractos para establecer si existe diferencia entre ambas especies de *Cornutia*.

VI. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos etanólicos de las plantas a estudiar y que se utilizan para tratamiento de diversas afecciones posee un efecto inmunomodulador *in vitro*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y muestra

1. Universo de trabajo

Plantas medicinales a las que se les atribuyen actividades inmunomoduladoras.

2. Muestra

Extractos etanólicos de hojas de *Cornutia pyramidata* y *Cornutia grandifolia*.

B. Recursos humanos

1. Investigadora

Br. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

2. Asesores

Lic. Armando Cáceres, Q.B.

MA. Ana Margarita Paz de Ramírez, Q.B.

C. Recursos institucionales

1. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamento de Citohistología, Universidad de San Carlos de Guatemala.
2. Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Universidad de San Carlos de Guatemala.
3. Laboratorio de Inmunodiagnóstico, Departamento de Citohistología, Universidad de San Carlos de Guatemala.
4. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).
5. Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA, S.A.

D. Materiales

1. Equipo

- Autoclave con controles manuales de temperatura (110-127°C), presión (0-4kgf/cm²) y cronómetro (1-60 min). Liberador de presión y agua e indicadores de alerta. Marca Omrón.
- Balanza analítica marca Mettler AE200 de un plato con cabina de vidrio.
- Balanza analítica marca Mettler PM600 de un plato. Peso máximo 610 g.
- Campana bacteriológica de bioseguridad Clase II marca Labconco con Luz UV-Visible.
- Centrífuga de placas IEC CL30 Termo Electrón Corporation con capacidad hasta de 6 microplacas.
- Centrífuga IEC CR-6000 International Equipment Company
- Evaporador giratorio con colector Brinckman color gris con alambique y accesorios. Marca Buchii. Modelo 19-548B-461.
- Incubadora color gris con controles y pantalla digitales, con 6 parrillas de metal adicionales. Puerta de vidrio. Marca fisher Scientific. Modelo 6370. Temperatura utilizada: 37°C
- Lector ELISA EL340 Bio-Tek Instruments
- Microscopio cabeza color blanco y negro con dos oculares 0x y objetivos 20x0.40, 10x0.25 y 4x0.10 con filtro No. 45-LBD-IF, cordón de energía eléctrica y bombilla de alógeno. Marca Olympus. Modelo BX40.
- Percolador de 2000 mL de acero inoxidable.
- Refrigerador de una puerta y congelador con tres parrillas en su interior, marca Admiral Dualtemp, temperatura de 2-10°C.
- Refrigerador de dos puertas con ocho parrillas en su interior, marca REVCO. Temperatura de 2-10°C.
- Vortex marca MaxiMix II color blanco con control de velocidades y selección de modos (full/power/touch).

2. Reactivos

a) *Ensayo linfoproliferativo*

- Histopaque
- XTT (Sal de Tetrazolio)
- Lectinas de Con A y PHA (Concavalina A y Fitohemaglutinina)
- PMS (Metosulfato de fenacina)
- Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
- RPMI-FBS
- PBS (solución amortiguadora de fosfatos)
- SDS (dodecil sulfato sódico)
- L-Glutamina 200 mM
- Extractos etanólicos de plantas

b) *Ensayo hemolítico para evaluar la actividad de complemento*

- Suero humano normal
- Suero humano inactivado (30 minutos 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 plantas
- Amortiguador salino de Veronal concentrado 5 veces (VSB 5X)
- Solución stock de Calcio/Magnesio
- Solución stock de EGTA (ácido etilen glicol -bis(2-aminoetiléter)N,N,N',N'-tetracético)
- VSB²⁺
- EGTA-VB
- VSB⁰
- EDTA-VB

3. Materiales

- Vasos de precipitar de 250-1000 μ L
- Cámara de Neubauer
- Filtros 0.2 μ m
- Frascos de tapón con rosca
- Jarra con candela
- Papel parafilm
- Placas estériles de 96 pozos de fondo plano con tapadera
- Placas estériles de 96 pozos de fondo en U con tapadera
- Pipetas automáticas de 10-200 μ L
- Pipetas automáticas de 200-1000 μ L
- Pipetas Pasteur
- Puntas amarillas de 10-200 μ L
- Puntas azules 200-1000 μ L
- Tubos Eppendorf de 500 μ L y 2000 μ L
- Tubos Vacutainer con EDTA de 5 mL
- Tubos Vacutainer sin anticoagulante de 10 mL
- Tubos cónicos de 50 mL
- Tubos cónicos de 15 mL

E. Metodología

1. Obtención de los extractos etanólicos de las plantas, según Sharapin 2000 (37).

- Se secaron y homogenizaron las flores y hojas de las especies de *Cornutia* tamizando el material y pesando como mínimo 200 g de droga vegetal para después colocarlo en el percolador con etanol al 95%.
- Se dejó reposar durante 3 días para obtener el mensturo y se destiló en rotavapor hasta obtener la mayor cantidad de extracto pasándolo a la desecadora para eliminar la mayor cantidad de líquido.

- Se calculó el porcentaje de rendimiento de las plantas:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso final extracto}}{\text{Peso inicial planta}} \times 100$$

2. Ensayo linfoproliferativo

a) *Aislamiento y preparación de linfocitos*

- En la campana de flujo laminar se agregaron 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA sobre 5 mL de Histopaque utilizando una pipeta automática.
- Se centrifugó durante 5 minutos en frío (2-8°C) a 2400 rpm y a temperatura ambiente por 15 minutos a la misma revolución.
- Cuidadosamente se aspiró la capa de linfocitos formada y se transfirieron todas las capas de linfocitos a un tubo cónico, agregándole 10 mL de PBS.
- Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 1400 rpm durante 5 minutos para realizar su lavado.
- El sobrenadante se decantó y el procedimiento se repitió 3 veces más.
- Las células se resuspendieron en 2 mL de RPMI.

b) *Conteo celular*

- Se tomaron 10 μ L de la suspensión celular y se colocaron en la cámara de Neubauer para su recuento.
- Se contaron los 4 cuadrantes de la cámara y se ajustó la concentración de linfocitos con RPMI hasta contar 375 células en cada cuadrante para llegar a una concentración final de 1.5×10^7 células/mL.
- Se hizo el recambio de RPMI por el mismo volumen de RPMI-FBS centrifugando en frío (2-8°C) durante 1400 rpm.

c) *Reto linfoproliferativo*

- Se incubó toda la placa en una jarra con candela durante 4 días a 37°C con 5% de CO₂.

- 25 μ L de la solución de XTT fueron agregados a cada uno de los pozos y se incubó nuevamente a 37°C durante 4 horas cubriendo la placa con papel aluminio para evitar el contacto con la luz ya que este reactivo es fotosensible.
- 25 μ L de SDS fueron agregados como solución de parada de la reacción.
- La lectura se realizó espectrofotométricamente a 450 nm y se comparó la viabilidad de las células con el aumento de absorbancia.

3. Ensayo hemolítico para evaluar la actividad del complemento

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

i) Para la sensibilización y preparación de eritrocitos de carnero:

- Se mezclaron 2 mL de eritrocitos de carnero en 2 mL de solución de Alsever y se centrifugó en frío (2-8°C) a 2,500 rpm durante 5 minutos.
- El sobrenadante se decantó y el botón de células empacadas se resuspendió en 10 mL de solución salina centrifugando en frío (2-8°C) a 1,400 rpm por 5 minutos repitiendo este procedimiento dos veces más. Se mantuvo este botón sobre hielo.
- 200 μ L de estas células empacadas fueron resuspendidas en 9.8 mL de VSB²⁺.
- Se sensibilizaron 8 mL de la suspensión anterior agregando 7 mL de VSB²⁺ y 1 mL de la solución de trabajo de Amboceptor.
- Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se lavó 3 veces con VSB²⁺. El volumen decantado se reconstituyó con 16 mL de VSB²⁺.
- Se preparó una concentración de 4×10^8 células/mL contando 162 eritrocitos en cada cuadrante de rojos de la cámara de Neubauer. Se mantuvieron en frío hasta su utilización.

- 75 μL de extracto fueron agregados en los pozos de la fila A utilizando placas de fondo redondo, realizando diluciones seriadas 1:3 con 50 μL con VSB^{2+} (desde la fila B a G) partiendo de una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- ii) Los controles para la medición de actividad sérica y hemólisis se prepararon de la siguiente forma:
- 50 μL de VSB^{2+} a los pozos H1-H6.
 - 50 μL de la solución de suero humano activo a los pozos H1-H3.
 - 50 μL de la solución de trabajo del suero humano inactivado a los pozos H4-H6
 - 100 μL de VSB^{2+} a los pozos H7-H9 (0% de hemólisis).
 - 100 μL de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis).
- iii) La placa se preparó en la siguiente forma:
- Se agregaron 50 μL de la solución de trabajo del suero humano inactivado, a los pozos blancos de muestra (columnas 3, 6, 9, 12 de A-G).
 - Se agregaron 50 μL de la solución de suero humano activo a todos los pozos con diluciones del extracto.
 - Se cubrió la placa con papel aluminio y se preincubó a 37°C por 30 minutos.
 - Después de la preincubación se agregaron a todos los pozos de la placa, 50 μL de la suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados previamente, cubriéndola e incubándola a 37°C por 60 minutos.
 - La placa se centrifugó a 2,500 rpm por 2 minutos.
- iv) Medición de hemólisis
- Se colocaron 200 μL de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.

- 50 μL de los sobrenadantes de la placa anteriormente centrifugada se colocaron en la placa de fondo plano, manteniendo el orden original.
- La lectura se realizó espectrofotométricamente a 405 nm y se comparó la hemólisis producida, la cual es directamente proporcional a la absorbancia obtenida.

b) Determinación hemolítica para la actividad de la vía alterna del complemento

i) Para la sensibilización y preparación de eritrocitos de sangre de conejo se realizó el siguiente procedimiento:

- Se lavaron 3 veces los eritrocitos de conejo en solución salina.
- Se preparó una suspensión de eritrocitos de conejo con EGTA-VB a una concentración de 1.15×10^8 células/mL, contando 42 eritrocitos en cada cuadrante de rojos en la cámara de Neubauer, manteniéndola en hielo hasta su utilización.
- 75 μL de extracto se agregaron en los pozos de la fila A y se realizaron diluciones seriadas 1:3 con 50 μL de EGTA-VB (desde la fila B a G), iniciando con una concentración de 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

ii) La preparación de controles para la medición de actividad sérica y hemólisis se realizó con:

- 50 μL de EGTA-VB a los pozos H1-H6.
- 25 μL de la solución de suero humano activo a los pozos H1-H3.
- 25 μL de la solución de trabajo del suero humano inactivado a los pozos H4-H6
- 100 μL de EGTA-VB a los pozos H7-H9 (0% de hemólisis).
- 100 μL de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis).

iii) Preparación de la placa

- Se agregaron 25 μL de la solución de trabajo del suero humano inactivado a los pozos blancos de muestra (columnas 3, 6, 9, 12 de A-G).
- Así mismo, 25 μL de la solución de suero humano activo se agregaron a todos los pozos con diluciones del extracto.
- Se cubrió la placa con papel aluminio y preincubó a 37°C por 30 minutos.
- Después de la preincubación se agregaron a todos los pozos de la placa 25 μL de la suspensión de eritrocitos de conejo, cubriéndola e incubándola a 37°C por 30 minutos.
- La placa se centrifugó a 2500 rpm por 2 minutos.

iv) Medición de hemólisis

- Se colocaron 200 μL de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.
- 50 μL de los sobrenadantes de la placa anteriormente centrifugada se colocaron en la placa de fondo plano, manteniendo el orden original.
- La lectura se realizó espectrofotométricamente a 405 nm y se comparó la hemólisis producida con la absorbancia, ya que ambos datos son directamente proporcionales.

c) Cálculos

- i) Determinación de la actividad sérica expresada como porcentaje de lisis:

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

ii) Actividad inhibitoria de la muestra vrs. control

- Ejemplo: para la concentración más alta de la muestra 1 (A1, A2, A3)

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

iii) Determinación de CH₅₀

La CH₅₀ fue la concentración menor del extracto en la cual se obtuvo un 50% de inhibición o estimulación del complemento.

F. Diseño estadístico

1. Tipo de estudio: Cuasi-experimental.

2. Variables

- a) *Variable independiente*: plantas medicinales nativas guatemaltecas.
- b) *Variable dependiente*: actividad inmunomoduladora *in vitro* (complemento y linfoproliferación) de los extractos etanólicos de las dos plantas seleccionadas.

3. Validez del método

a) Ensayo linfoproliferativo (FASE I)

- Se evaluó la actividad de las lectinas Con A y PHA de la siguiente forma:
 - Grupo A: lectina Con A (1 mg/mL)
 - Grupo B: lectina PHA (1 mg/mL)
 - Grupo C: control negativo
- Cada lectina se repitió 12 veces y se utilizó Con A en la siguiente fase, ya que presentó mejor actividad.

b) Ensayo linfoproliferativo (FASE II)

Número de réplicas: por conveniencia (5 réplicas).

- Grupo A: extracto etanólico de *C. pyramidata*.

- Grupo B: extracto etanólico de *C. grandifolia*.
- Cada grupo tuvo su correspondiente control positivo (lectina) y negativo (buffer).
- Se determinó la concentración inmunomoduladora efectiva mínima de los extractos, confrontándolos a las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 $\mu\text{g/mL}$, siguiendo el diseño anteriormente descrito. No hubo aleatorización por razones técnicas.

c) *Ensayo hemolítico para determinar la actividad del complemento*

Número de réplicas: por conveniencia (5 réplicas).

- Se realizó una curva para mostrar la actividad sérica del pool del suero humano normal empleado.
- Se eligió la concentración que demostró una actividad entre 30 - 70% como control para demostrar que todos los componentes del sistema de complemento presentes en el suero son funcionales.
- Se utilizó agua desmineralizada como control positivo (100% de hemólisis).
- Se utilizó amortiguador PBS como control negativo (0% de hemólisis).
- Se determinó la concentración efectiva mínima de los extractos confrontándolos a diferentes concentraciones: 500, 166.66, 55.55, 18.52, 6.17, 2.06 y 0.69 $\mu\text{g/mL}$.
- La metodología se aceptó si los resultados obtenidos presentaron un rango de error de $\pm 10\%$ en la repetibilidad.
- No existió aleatorización por razones técnicas.

4. Análisis de datos

Los datos de los % de inhibición obtenidos se analizaron con un ANOVA y el test de Tukey a un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

La comparación entre plantas se realizó con una prueba de hipótesis binomial al 95% de confianza y las respuestas a medir fueron:

a) Ensayo linfoproliferativo

Los resultados se evaluaron de acuerdo a la siguiente escala:

- % de estimulación o inhibición de 0-25% no significativo = inalterado.
- % de estimulación de 25-30% = E±
- % de estimulación de 31-100% = E+
- % de estimulación de 101-200% = E++
- % de estimulación de >201% = E+++
- % de inhibición de 25-30% = I±
- % de inhibición de 31-100% = I+
- % de inhibición de 101-200% = I++
- % de inhibición de >201% = I+++

Los resultados fueron POSITIVOS si el extracto aumentó (actividad estimuladora) o disminuyó (actividad inhibidora) la proliferación de linfocitos y NEGATIVA si no existió alteración en los mismos (38).

b) Ensayo hemolítico para determinar la actividad del complemento

- Los resultados a medir fueron POSITIVOS si el extracto aumentó (actividad estimuladora) o disminuyó (actividad inhibitoria) en un 50% la concentración de hemoglobina comparado frente al resultado de la actividad sérica y si la concentración del extracto fue igual o menor a 500 µg/mL. El resultado fue NEGATIVO si la concentración de hemoglobina liberada comparada con la actividad sérica y el control negativo fue inalterada (39).

VIII. RESULTADOS

A. Selección de plantas y obtención de extractos etanólicos

Las plantas evaluadas en este estudio son utilizadas para diferentes afecciones, entre las que se pueden mencionar dolores corporales, inflamaciones, fiebre, infecciones de garganta, entre otras. En la tabla 1 se pueden observar que se obtuvieron 38.84 g de extracto al 95% de *C. pyramidata* y 32.46 g de *C. grandifolia*, así como un porcentaje de rendimiento de 15.54% y 14.75% respectivamente. Todos los cálculos se realizaron respecto a los gramos de droga seca percolada.

Tabla 1. Rotaevaporación del extracto etanólico al 95% de *C. pyramidata* y *C. grandifolia*

Planta (flores y hojas)	Gramos de extracto obtenido	% de rendimiento (en base a droga seca)
<i>Cornutia pyramidata</i>	38.84 g	15.54%
<i>Cornutia grandifolia</i>	32.46 g	14.75%

Fuente: datos experimentales

B. Evaluación de la actividad linfoproliferativa

En los ensayos de linfoproliferación, en los que se evaluó la actividad de los extractos etanólicos sobre la actividad linfocitaria, se obtuvo que *C. grandifolia* presentó una inhibición de proliferación entre 31-100% a una concentración de 1,000 µg/mL, mientras que el extracto de *C. pyramidata* fue inactivo en todas las concentraciones evaluadas ($p < 0.05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad inmunomoduladora de extractos etanólicos al 95% de *C. pyramidata* y *C. grandifolia* sobre linfocitos

Concentración (µg/mL)	<i>C. pyramidata</i>		<i>C. grandifolia</i>	
	% Inhibición Media ± DS	Actividad*	% Inhibición Media ± DS	Actividad*
1000	-7 ± 22	-	61 ± 11	I+
500	-5 ± 5	-	15 ± 23	-
250	-8 ± 12	-	7 ± 23	-
125	-7 ± 14	-	7 ± 14	-
62.5	-14 ± 17	-	-9 ± 23	-
31.25	8 ± 9	-	-2 ± 15	-
15.62	0 ± 6	-	-8 ± 27	-

* (I+) = % Inhibición 31-100% (p < 0.05)

(-) = % Estimulación o Inhibición 0-25% (p < 0.05)

Fuente: datos experimentales

C. Evaluación de la actividad sobre el sistema de complemento vía clásica

Como se observa en la tabla 3, al evaluar la actividad de los extractos etanólicos sobre el sistema de complemento en su vía clásica, ambos presentaron una actividad inhibitoria mayor del 50% a concentraciones de 500 µg/mL y 166.67 µg/mL (*C. pyramidata*) y 500 µg/mL (*C. grandifolia*) (p < 0.05).

Tabla 3. Actividad de *C. pyramidata* y *C. grandifolia* sobre la vía clásica del complemento

Concentración (µg/mL)	<i>C. pyramidata</i>		<i>C. grandifolia</i>	
	% Inhibición Media ± DS	Actividad *	% Inhibición Media ± DS	Actividad*
500	82 ± 5	+	93 ± 16	+
166.67	53 ± 12	+	31 ± 4	-
55.56	39 ± 9	-	3 ± 4	-
18.51	24 ± 13	-	13 ± 1	-
6.17	20 ± 17	-	-5 ± 19	-
2.06	6 ± 11	-	-18 ± 9	-
0.68	-1 ± 4	-	8 ± 5	-

* (+) = POSITIVA con un % hemólisis > 50% (p < 0.05)

(-) = NEGATIVA con un % hemólisis < 50% (p < 0.05)

Fuente: datos experimentales

D. Evaluación de la actividad sobre el sistema de complemento vía alterna

Al realizar el ensayo de los extractos sobre el sistema de complemento en su vía alterna, únicamente *C. pyramidata* presentó una actividad inhibitoria mayor del 50% a concentraciones de 500 µg/mL, 166.67 µg/mL y 55.56 µg/mL ($p < 0.05$).

Tabla 4. Actividad extractos etanólicos al 95% de *C. pyramidata* y *C. grandifolia* sobre la vía alterna del complemento

Concentración (µg/mL)	<i>C. pyramidata</i>		<i>C. grandifolia</i>	
	% Inhibición Media ± DS	Actividad *	% Inhibición Media ± DS	Actividad*
500	70 ± 14	+	32 ± 12	-
166.67	75 ± 16	+	23 ± 14	-
55.56	66 ± 14	+	23 ± 19	-
18.51	25 ± 20	-	30 ± 25	-
6.17	11 ± 25	-	21 ± 23	-
2.06	21 ± 21	-	0 ± 10	-
0.68	-10 ± 22	-	2 ± 12	-

* (+) = POSITIVA con % hemólisis > 50% ($p < 0.05$)
 (-) = NEGATIVA con % hemólisis < 50% ($p < 0.05$)

Fuente: datos experimentales

IX. DISCUSIÓN

En el presente estudio fue evaluada la actividad inmunomoduladora *in vitro* de extractos etanólicos de las plantas *Cornutia pyramidata* y *C. grandifolia*, ambas fueron seleccionadas con base en su uso popular medicinal para distintas afecciones sin registros previos de su actividad sobre el sistema de complemento (vía clásica y alterna) o sobre los linfocitos.

En la preparación de los extractos etanólicos de ambas plantas, se obtuvo un rendimiento mayor de *C. pyramidata* (15.54%) que de *C. grandifolia* (14.75%), evidenciando que con poca cantidad de droga vegetal de ambas plantas se puede obtener material suficiente para la elaboración de preparaciones farmacológicas (Tabla 1).

El extracto etanólico de *C. grandifolia* presentó una actividad inhibitoria del crecimiento de linfocitos del 31 al 100% a una concentración de 1,000 µg/mL, con un nivel de confianza al 95% (Tabla 2). Así mismo, esta planta presentó una actividad inhibitoria mayor del 50% sobre el complemento en su vía clásica, a una concentración de 500 µg/mL (Tabla 3), pero no mostró actividad sobre la vía alterna ($p < 0.05$) (Tabla 4). Se conoce que la infusión de las hojas de esta planta se utiliza popularmente para tratar fiebre, enfermedades inflamatorias e infecciones de estómago y garganta. Entre los componentes químicos aislados en otros estudios a partir de las hojas de *C. grandifolia* se encuentran las cornutinas, nombradas desde la letra C hasta L. Estas son diterpenoides a los que se les atribuyen propiedades medicinales y de ligera actividad contra las cepas poW y Dd2 de *Plasmodium falciparum* (40). Esta planta también es utilizada como cerco vivo por la presencia de las cornutinas A y B que en ensayos *in vitro* demostraron actividad repelente contra las hormigas *Acromyrmex octospinosus*, creando una nueva estrategia para aumentar la productividad de los cultivos (41).

No se obtuvo actividad del extracto etanólico de *C. pyramidata* al realizar el ensayo de proliferación del linfocitos ($p < 0.05$) (Tabla 2). Sin embargo, al evaluar su actividad sobre el complemento, presentó actividad inhibitoria mayor del 50% a

concentraciones de 500 y 166.67 $\mu\text{g/mL}$ (vía clásica) y 500, 166.67 y 55.56 $\mu\text{g/mL}$ (vía alterna) con un nivel de confianza del 95% (Tabla 3 y 4), por lo que es de interés farmacológico que presente una actividad positiva a concentraciones bajas de extracto. Esta planta también se utiliza en los cultivos ya que se le atribuyen efectos alelopáticos (42).

Algunos mecanismos de regulación del sistema inmune son la producción de células T reguladoras (Th 3 o Treg) las cuales no son dependientes de la interacción célula-célula y son responsables de la producción de interleucinas inhibitorias del crecimiento de células Th1 y macrófagos, tales como la interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4); el factor transformador del crecimiento (TGF- β) que disminuye la proliferación de linfocitos T y B, y el interferón gamma (INF- γ) que inhibe el crecimiento de linfocitos Th2. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que niveles elevados de IL-10 se han encontrado en otras enfermedades autoinmunes, tales como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea, demostrando que esta interleucina puede actuar como un potencial inmunorregulador (43).

La inhibición de la activación de la vía clásica y alterna del complemento, disminuye la actividad citolítica, quimiotáctica, anafiláctica y fagocítica del mismo, y con ello los procesos inflamatorios, fenómeno básico de la defensa contra infecciones. El mecanismo más simple de regulación del complemento es la baja concentración y labilidad de muchos de sus factores así como en distintos puntos tanto en la vía clásica como en la alternativa, centrándose fundamentalmente en la activación de C3. También se encuentra el inhibidor de la C1 estearasa (C1inh) el cual inhibe la formación de C3b convertasa de la vía clásica por su capacidad de unión a los fragmentos C1r y C1s. El factor C4BP tiene la capacidad de captar C4b facilitando su disociación del complejo C4b2a e inhibiendo la actividad de la convertasa de C3. La regulación de C3, al ser éste el factor central en la activación del complemento, es probablemente el mecanismo de regulación más importante. La capacidad del complejo de ataque a membranas (CAM) de lisar las células puede ser modulada también por una proteína circulante llamada SP-40,40 la cual tiene un mecanismo de acción desconocido (44).

Todos estos mecanismos además de disminuir los procesos de inflamación, también regulan la actividad de la inmunidad adaptativa del organismo, ya que el complemento está relacionado con la activación y potencialización de la inmunidad humoral principalmente vía receptores CD21 y CD35 (45, 46).

Según criterios prevaecientes, la descripción taxonómica de la última botánica publicada tiene prioridad sobre las versiones descritas que le antecedan. La Flora de Nicaragua versión 2001 indica que *C. pyramidata* tiene como sinonimia a *C. grandifolia*. Sin embargo, en la Flora de Guatemala versión 1970, ambas especies se clasifican como diferentes. Como se aprecia en el Anexo 5, existen diferencias morfológicas entre ambas especies, y en esta investigación se encontraron diferencias en la bioactividad *in vitro* a un nivel de confianza al 95%. En base a los resultados de este trabajo y en comparación de las descripciones en la Flora de Guatemala y Flora de Nicaragua, los resultados apoyan la determinación de la Flora de Guatemala en separar a ambas especies como diferentes, así como la comprobación de la hipótesis de este estudio.

X. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *C. pyramidata* posee una actividad inhibidora mínima sobre la vía clásica del complemento a una concentración de 166.67 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$). El extracto etanólico de *C. grandifolia* posee una actividad inhibidora de la vía clásica del complemento a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$).
2. *C. pyramidata* presenta una actividad inhibitoria mínima sobre la vía alterna del complemento a una concentración de 55.56 $\mu\text{g/mL}$. *C. grandifolia* no presenta actividad *in vitro* sobre la vía alterna del complemento ($p < 0.05$).
3. La actividad linfoproliferativa es inhibida entre 31 y 100% por el extracto etanólico de *C. grandifolia* a una concentración de 1,000 $\mu\text{g/mL}$. *C. pyramidata* no presenta actividad sobre la actividad linfoproliferativa *in vitro* ($p < 0.05$).
4. La actividad inmunomoduladora de cada uno de los extractos es diferente, en donde *C. pyramidata* presenta una mejor actividad inhibitoria mínima sobre la vía clásica y alterna del complemento y *C. grandifolia* una actividad inhibitoria de la proliferación de linfocitos con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).
5. La demostración de la actividad inhibitoria sobre la actividad del complemento o linfoproliferación de las especies de *Cornutia*, comprueba la hipótesis de este estudio y avala y su uso popular como un antiinflamatorio
6. Con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), se demuestra que existen diferencias farmacológicas entre ambas especies de *Cornutia*, lo que indica que las muestras colectadas pertenecen a especies diferentes.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos *in vivo* que apoyen la actividad de los extractos etanólicos de *Cornutia* demostrada en este trabajo de investigación.
2. Evaluar la actividad *in vitro* e *in vivo* en extractos de diferente polaridad de ambas especies de *Cornutia*.
3. Realizar un ensayo fitoquímico a ambas especies de *Cornutia*, para conocer los metabolitos secundarios pertenecientes a estas plantas.
4. Realizar estudios fitoquímicos para implicar la actividad biológica con algún grupo químico que podría explicar su actividad farmacológica.
5. Continuar con otros estudios para evaluar la actividad inmunomoduladora de otras plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de diversas afecciones.
6. Realizar ensayos de análisis molecular a las dos especies de *Cornutia* utilizadas en este estudio, para establecer si existe realmente diferencia a nivel molecular o bien, son la misma especie.

XII. REFERENCIAS

1. Adelman D, Casale T, Corren J. Alergia e Inmunología. España: Marbán. 2005. 544p.
2. Chaplin D. Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 117: 430-435.
3. Stites D, Terr A. Inmunología básica y clínica. 10ª edición. México: Manual Moderno. 2001. 1055p.
4. Sell S. Immunology, Immunopathology and Immunity. 4ª. Edición. USA: Elsevier. 1987. 852p.
5. Janeway C, Travers P, Walport M. Immunobiology. The immune system in health and disease. 4ª edición. Elsevier. 1999. 339p.
6. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. England: Gower Medical Publishing. 1985.
7. Iáñez E. Curso de Inmunología. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. España. 1999.
8. Kuipers S *et al.* A hemolytic assay for the estimation of functional mannose-binding lectin (MBL) levels in human serum. *Journal of Immunological Methods*. 2002; 268: 149-157
9. Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999; 31: 539-544.
10. Rose N, Hamilton R, Detrick B. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6ª. Edition. USA: ASM Press. 2002. 1322p.
11. George A, Stark J, Chan C. Understanding specificity and sensitivity of T-cell recognition. *Trends in Immunology*. 2005; 26: 653-658.
12. Ramayo L, Soba M, Mundo S. Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos *in vitro*. *Inmunología Veterinaria*. 2005; 7: 1-9.
13. Gaines H, Andersson L, Biberfeld G. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell in whole blood culture by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1996; 195: 63-72.

14. Scudiero D *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988; 48:4827-33.
15. Vistica D *et al.* Tetrazolium-based assay for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research* (1991) 51: 2515-20.
16. Mata J, Quesada E, Molina I. Actividad antiproliferativa sobre células T de exopolisacáridos sulfatados producidos por microorganismos halófilos moderados. *Inmunología*. 2005; 24: 84-85.
17. Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2002; 1: 21-27.
18. Tzianabos A. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clinical and Microbiological Review*. 2000; 13: 523-533.
19. Schepetkin I, Quinn M. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006; 6: 317-333.
20. Classen B, Thude S, Blaschek W, Wack M, Bodinet C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. *Phytomedicine*. 2006; 13: 688-694.
21. Rininger J, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; 68: 503-510.
22. Castillo C. Actividad moduladora del sistema del complemento de cinco plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de infecciones protozoarias intracelulares. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. 49p.
23. Alvarez E. Actividad inmunomoduladora de rizoma y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanum*. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. 53p.

24. Alonso J. Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Argentina: ISIS Ediciones S.R.L. 1998. 1039p.
25. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Primera edición. Guatemala: Editorial Universitaria. 1996. 402p.
26. Ocampo R, Martínez J, Cáceres A. Manual de agrotecnología de plantas medicinales nativas. Costa Rica: Ediciones Sanabria. 2007. 140p.
27. Tramil. Farmacopea Vegetal Caribeña. República Dominicana: Ediciones Emile Désormeaux. 1997. 360p.
28. Gibson D. Verbanaceae. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 24: 196-197. 1970.
29. Tejeda S. Estudio etnobotánico de las plantas medicinales de 6 comunidades del municipio de San Juan Chamelco del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Agronomía) 2003.
30. Dieseldorff I. Las plantas medicinales del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Tipografía Nacional, 1977.
31. Rahalison L *et al.* Screening for antifungal activity of Panamanian plants. International Journal of Pharmacognosy. 1993; 31: 68-76.
32. Marston A *et al.* Screening or Panamanian plants for molluscicidal activity. International Journal of Pharmacognosy. 1996; 34: 15-18.
33. Matsuse I *et al.* A search for antiviral properties in Panamanian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 64: 15-22.
34. Molina R. Determinación de la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata* (Jorobté). Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 63p.
35. Vademécum de prescripción de plantas medicinales: Fitoterapia. 3ª. Edición. España: Masson, S.A, 1998. 1148p.
36. Stevens W, Ulloa C, Pool A, Montiel O Flora de Nicaragua. Angiospermas (*Pandanaceae-Zygophyllaceae*). Missouri Botanical Garden Press. Tomo III. 2001.
37. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá. Convenio Andrés Bello y CYTED. 2000. 247p.

38. Protocolo para la medición de la proliferación de linfocitos T. Departamento de Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Universidad de Utrecht, Holanda.
39. Protocolo para la determinación de la actividad del sistema de complemento vía clásica y vía alterna. Departamento de Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Universidad de Utrecht, Holanda.
40. Jenett-Siems K *et al.* Cornutin C-L, neo-clerodane-type diterpenoids from *Cornutia grandifolia* var. *intermedia*. *Phytochemistry*. 2003; 64: 797-804.
41. Chen T, Galinis D, Wiemer D. Cornutin A and B : Novel diterpenoid repellents of leafcutter ants from *Cornutia grandifolia*. *Journal of Organic Chemistry*. 1992; 57: 862-866.
42. Caamal-Maldonado J, Jiménez-Osorio J, Torres-Barragán A, Anaya A. The use of allelopathic legume cover and mulch species for weed control in cropping systems. *Agronomy Journal*. 2001; 43: 27-36.
43. Kalden J, Herrmann M. Apoptosis and Autoimmunity. From mechanisms to treatments. WILEY-VCH. 2003.
44. Fujita T, Endo Y, Nonaka N. Primitive complement system-recognition and activation. *Molecular Immunology*. 2004; 41: 103-111.
45. Carroll M. The complement system in B cell regulation. *Molecular Immunology*. 2004; 41: 141-146.
46. Carroll M. The complement system in regulation of adaptive immunology. *Nature Immunology*. 2004; 5: 981-986.

ANEXOS

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

EDTA-VB	3.72 g EDTA 1000 mL VSB ⁰
EGTA-VB	200 mL VSB stock 40 mL EGTA stock
Lectinas STOCK	9 mg lectina 1 mL RPMI
L-glutamina 200 mM	0.292 gr L-glutamina 10 mL RPMI-FBS
PBS	9 1000 mL agua destilada
PMS	7.65 mg 5 mL PBS
RPMI-FBS	0.292 g L-glutamina 10 mL suero fetal bovino 90 mL RPMI-1640
Solución Calcio/Magnesio STOCK	10.17g MgCl ₂ .6H ₂ O 2.21 g CaCl ₂ .H ₂ O 100 ml de agua destilada
Solución EGTA STOCK	7.6 g EGTA 200 ml de agua destilada. Ajustar pH a 7.35 y agregar 3.075 g MgSO ₄
Solución de trabajo Lectina	100 µL Lectina stock 9 mL RPMI-FBS
Solución de trabajo Amboceptor	10 µL Amboceptor 990 µL Solución Salina
Solución de trabajo Suero humano inactivado (Complemento vía clásica)	63 µL suero humano inactivo stock 5 mL VSB ²⁺

Solución de trabajo Suero activo (Complemento vía clásica)	125 µL suero humano 10 mL VSB ²⁺
Solución de trabajo Suero humano inactivado (Complemento vía alterna)	500 µL suero humano inactivo stock 500 µL EGTA-VB
Solución de trabajo Suero activo (Complemento vía alterna)	1000 µL suero humano 1000 µL EGTA-VB
Solución de trabajo XTT + PMS	1 mL XTT stock 4 mL RPMI 25 µL PMS stock
Solución salina	8.5 gr NaCl 1000 mL agua destilada
Suero humano inactivado STOCK	Incubar 30 minutos a 56°C
VSB STOCK 5X	41.5 g NaCl 5.1 g Veronal –Barbital Sódico- 800 ml de agua destilada. Ajustar pH a 7.35
VSB⁰	200 mL VSB stock 800 mL agua destilada
VSB²⁺	200 mL VSB stock 1 mL Ca/Mg stock
XTT STOCK	5 mg XTT 1 mL PBS

2. PLACA DE LINFOPROLIFERACIÓN

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

CLAVE	
MUESTRA	50 μ L extracto (diluciones sucesivas 1:2), 50 μ L lectina, 50 μ L linfocitos
BLANCO MUESTRA	50 μ L extracto, 50 μ L lectina, 50 μ L RPMI-FBS
CONTROL POSITIVO	50 μ L RPMI-FBS, 50 μ L lectina, 50 μ L linfocitos
CONTROL NEGATIVO	100 μ L RPMI-FBS, 50 μ L lectina

3. PLACA DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL COMPLEMENTO VÍA CLÁSICA

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

CLAVE	
MUESTRA	50 µL extracto (diluciones sucesivas 1:3), 50 µL suero activo, 50 µL eritrocitos de carnero
BLANCO MUESTRA	50 µL extracto (diluciones sucesivas 1:3), 50 µL suero inactivo, 50 µL eritrocitos de carnero
ACTIVIDAD SUERO ACTIVO	50 µL VSB ²⁺ , 50 µL suero activo, 50 µL eritrocitos de carnero
ACTIVIDAD SUERO INACTIVO	50 µL VSB ²⁺ , 50 µL suero inactivo, 50 µL eritrocitos de carnero
CONTROL NEGATIVO	100 µL VSB ²⁺ , 50 µL eritrocitos de carnero
CONTROL POSITIVO	100 µL agua destilada, 50 µL eritrocitos de carnero

4. PLACA DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL COMPLEMENTO VÍA ALTERNA

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

CLAVE	
MUESTRA	50 µL extracto (diluciones sucesivas 1:3), 25 µL suero activo, 25 µL eritrocitos de conejo
BLANCO MUESTRA	50 µL extracto (diluciones sucesivas 1:3), 25 µL suero inactivo, 25 µL eritrocitos de conejo
ACTIVIDAD SUERO ACTIVO	50 µL EGTA-VB, 25 µL suero activo, 25µL eritrocitos de conejo
ACTIVIDAD SUERO INACTIVO	50 µL EGTA-VB, 25 µL suero inactivo, 25 µL eritrocitos de conejo
CONTROL NEGATIVO	100 µL EGTA-VB, 25 µL eritrocitos de conejo
CONTROL POSITIVO	100 µL agua destilada, 25 µL eritrocitos de conejo

5. Cuadro comparativo entre las especies *C. pyramidata* y *C. grandifolia*

	<i>C. pyramidata</i>	<i>C. grandifolia</i>
Familia	Verbenaceae	Verbenaceae
Nombre común	Jorobté, joro'kté, oromté, sak'i'ka, palo cuadrado	Flor lila, cucaracha, hoja de zope, lat-ché (Guatemala), tzultesnuk, matasano (Honduras), Bwa kasav (República Dominicana)
Descripción botánica	Árbol o arbusto de 5 m de alto. Hojas con pecíolos de 1-5 cm de largo; láminas ovadas a elípticas de 7-30 cm de largo y 5-19 de ancho	Arbusto alto de hasta 12 m. El tronco llega a medir 15 cm de diámetro. Hojas pubescentes, ovaladas o elípticas, de 4-20 cm de largo y 4-14 cm de ancho, margen entero
Inflorescencias	Flores azules o púrpuras numerosas	Panículas piramidales, terminales, de 10 a 40 cm de largo; flores azules o púrpuras terminales o subterminales, numerosas de 10 a 12 cm de largo
Fruto	Forma de cono aplanado a veces copular o globoso de 3-5 mm de largo	Drupa azulada o negra, esférica y puberulenta de 3 a 6 mm de diámetro

	<i>C. pyramidata</i>	<i>C. grandifolia</i>
Distribución	Alta Verapaz, Guatemala, Izabal, Sacatepéquez. México, Honduras y Panamá	Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez, Zacapa. México, Honduras, El Salvador, Nicaragua y la cuenca del Caribe
Actividad sobre la vía clásica del complemento <i>in vitro</i>	Inhibitoria a concentraciones de 500 y 166.67 µg/mL	Inhibitoria a una concentración de 500 µg/mL
Actividad sobre la vía alterna del complemento <i>in vitro</i>	Inhibitoria a concentraciones de 500, 166.67 y 55.56 µg/mL	Ninguna
Actividad sobre la proliferación lifocitaria <i>in vitro</i>	Ninguna	Inhibitoria entre 31 y 100% a una concentración de 1000 µg/mL

Fuente: Gibson D. Verbanaceae. Flora of Guatemala

Datos experimentales



Inflorescencias y hojas de *C. pyramidata*



Fruto de *C. pyramidata*



Inflorescencias y hojas de *C. grandifolia*

Keila Mariana Guerrero Gutiérrez
Autora

M.A. Ana Margarita Paz de Ramírez, Q.B.
Asesora

Lic. Armando Cáceres, Q.B.
Asesor

M.Sc. Alba Marina Valdés de García
Revisora

M.A. María Eugenia Paredes, Q.B.
Revisora

M.Sc. Vivian Matta de García
Directora Escuela Q.B.

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.
Decano Facultad CC.QQ y Farmacia