

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**“Actividad Inmunomoduladora de Especies Cultivadas Nativas de Mesoamérica”  
(*P. alliacea* L y *S. domingensis* Willd)**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

NANCY IVONNE PICHARDO GONZÁLEZ  
ANITA YOLANDA TEO OCHAETA

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2010

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“Actividad Inmunomoduladora de Especies Cultivadas Nativas de Mesoamérica”  
(*P. alliacea* L y *S. domingensis* Willd)**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

NANCY IVONNE PICHARDO GONZÁLEZ  
ANITA YOLANDA TEO OCHAETA

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2010

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Licdo. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Lica. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

## DEDICATORIA

A DIOS	Fuente suprema de vida y sabiduría.
A NUESTROS PADRES	Por su amor, esfuerzos y sacrificios que hoy rinden sus frutos.
A NUESTROS HERMANOS	Por su apoyo incondicional.
A NUESTRA FAMILIA EN GENERAL	Por alentarnos en todo momento.
A NUESTROS AMIGOS	Por los buenos momentos compartidos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por brindarnos la oportunidad de superarnos.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por todos los conocimientos adquiridos.

Al Departamento de Citohistología, por el apoyo brindado en la realización de esta investigación.

A nuestro asesor, Lic. Armando Cáceres, por su guía, paciencia y conocimientos.

A nuestra revisora, Licda. Margarita de Paz, por su apoyo.

A las licenciadas Egly Alvarez y Miriam Barrera por toda su colaboración.

# INDICE

	Página
<b>1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN</b>	03
<b>2. RESUMEN</b>	04
<b>3. ANTECEDENTES</b>	
3.1 Sistema Inmune	06
3.2 Respuesta Inmune	06
3.3 Sistema de Complemento	07
3.4 Linfocitos	08
3.4.1 Linfocitos B	08
3.4.2 Linfocitos T	09
3.5 Inmunomodulación	09
3.6 Determinación de la Actividad Inmunomoduladora <i>in vitro</i>	11
3.6.1 Ensayos hemolíticos para la valoración de la actividad sobre el sistema de complemento	12
3.6.2 Ensayos para Valorar la Linfoproliferación	12
3.7 Actividad Inmunomoduladora de las Plantas	14
3.7.1 Investigaciones de algunas Plantas Inmunomoduladoras	17
3.8 Actividad Inmunomoduladora de <i>Petiveria alliacea</i> y <i>Smilax domingensis</i>	21
3.9 Monografías de las Plantas en Estudio	22
3.9.1 <i>Petiveria alliacea</i>	22
3.9.2 <i>Smilax domingensis</i>	27
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	34
<b>5. OBJETIVOS</b>	35
<b>6. HIPÓTESIS</b>	36
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	37
<b>8. RESULTADOS</b>	47
<b>9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	53

<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>11. RECOMENDACIONES</b>	<b>58</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>59</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>64</b>

# 1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Demostración de la actividad biológica de las plantas nativas de Mesoamérica que han sido sometidas a proceso de cultivo, ya que estudios preliminares sobre *P. alliacea* y *S. domingensis* silvestres indican que poseen actividad inmunomoduladora. Con este estudio se pretende determinar si las plantas sometidas a cultivo poseen la misma actividad que las silvestres, asegurando la calidad a largo plazo de la producción de dichas plantas en una forma sustentable y con una actividad reproducible.

La línea de investigación es la actividad inmunomoduladora de plantas medicinales nativas, dicha investigación se desarrollará en la Unidad de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 2. RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron las propiedades inmunomoduladoras *in vitro* de dos especies cultivadas nativas de Mesoamérica, (*P. alliacea* y *S. domingensis*), conocida popularmente como apacín y zarzaparrilla respectivamente por medio de ensayos de linfoproliferación y ensayos hemolíticos que demostraron la regulación del sistema de complemento en sus dos vías, por medio de extractos etanólicos y acuosos de hoja y raíz de *P. alliacea*, hojas, fruto y rizoma de *S. domingensis*. Dichas plantas han sido empleadas como plantas medicinales, a las que se les atribuyen las características de ser antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas, entre otras.

En la etapa inicial se realizó la recolección del material cultivado, procediendo a su percolación y rotaevaporación con etanol al 70 % para la obtención de los extractos etanólicos y para la obtención de extractos acuosos de las diferentes partes de las plantas fue a través de la infusión por sonicación y liofilización de los mismos, calculando su porcentaje de rendimiento.

Dentro de este estudio, se realizó una metodología colorimétrica para demostrar la actividad moduladora de la linfoproliferación de los extractos de las diferentes partes de las plantas, así como el determinar la concentración efectiva mínima (CEM). La metodología colorimétrica empleada, se realizó mediante una separación inicial de los linfocitos, los cuales se agregaron a una microplaca, la cual contenía una concentración conocida de los diferentes extractos, que posteriormente se incubaron por cuatro días, para luego obtener las actividades por medio de absorbancia tomadas con la ayuda de un lector de ELISA. Se empleó el mitógeno *Phaseolus vulgaris* (PHA), como control positivo y se determinó, junto con la CEM si la actividad que presenten los extractos es inhibitoria o estimuladora.

Los extractos que presentaron actividad lo hicieron de manera inhibitoria sobre la actividad linfocítica y se les determinó su CEM siendo: extracto etanólico de rizoma de *S. domingensis* (CEM de 250 µg/ml) y extractos acuosos de hoja y raíz de *P. alliacea* (CEM de 500 y 250 µg/ml, respectivamente) y hoja y rizoma de *S. domingensis* (CEM de 250 y 500 µg/ml, respectivamente). Mientras que en los extractos etanólicos de hoja de *P. alliacea*, fruto y hoja de *S. domingensis* mostraron actividad únicamente en la

concentración inicial de 1,000  $\mu\text{g/ml}$  y los extractos sin actividad fueron extracto etanólico de raíz de *P. alliacea* y extracto acuoso del fruto de *S. domingensis*

La evaluación sobre la actividad del sistema de complemento se efectuó mediante ensayos basados en la hemólisis de eritrocitos por el Complejo de Ataque a Membrana (CAM), el cual es generado al activarse el sistema de complemento; en este ensayo los eritrocitos actúan como células blanco y al ser activados se produce la lisis de eritrocitos, liberándose hemoglobina la cual es utilizada como parámetro para medir la actividad.

Los resultados obtenidos en el ensayo del sistema de complemento mostraron que tanto para la vía clásica como para la vía alterna, la mayoría de los extractos tanto etanólicos como acuoso de hoja y raíz de *P. alliacea*, hoja y rizoma de *S. domingensis* presentaron un efecto inhibitorio de ambas vías, determinado por su  $\text{CI}_{50}$ , por el contrario los extractos que no mostraron ninguna actividad fueron: extractos etanólicos y acuoso de fruto en la vía clásica y alterna y extracto acuoso de hoja de *S. domingensis* en vía clásica.

Esto se estableció con la determinación del  $\text{CI}_{50}$  considerando un límite de 15  $\mu\text{g/ml}$  como punto significativo de corte para establecer la presencia o ausencia de la actividad sobre las vías clásicas y alternas del complemento.

Puede decirse que los extractos evaluados son de gran interés por el efecto inhibitorio sobre la linfoproliferación y sobre el sistema de complemento, además de representar material vegetal cultivado que se puede aprovechar de mejor manera generando mayor volumen para su utilización en la disminución de la estimulación del sistema inmune y aprovechamiento de manera sostenible.

## **3. ANTECEDENTES**

### **3.1 SISTEMA INMUNE**

El término de inmunidad, se refiere a la respuesta de un hospedero a un agente agresor y a las consecuencias que se derivan. El sistema inmune es el encargado de proteger y de mantener la integridad del organismo ante una agresión de agentes patógenos, siendo sus funciones básicas: distinción de lo propio y lo extraño, especificidad y memoria. Posee una complejidad que compromete a diversos órganos y tejidos, presentando las líneas de defensa, inmunidad innata y de la inmunidad adquirida la cual suministra una respuesta específica frente a cada agente infeccioso (1,2). La memoria inmunológica específica, tiende a evitar que el agente infeccioso provoque enfermedad en una segunda infección (2).

### **3.2 RESPUESTA INMUNE**

La respuesta inmunológica se efectúa en tres etapas:

3.2.1 La primera comprende la llegada del antígeno y su contacto con los receptores específicos ubicados en la membrana del linfocito. En esta etapa los macrófagos efectúan su rol fagocitario y degradatorio, a efecto de presentar el antígeno a los linfocitos para el reconocimiento antigénico.

3.2.2 La segunda etapa muestra los mecanismos de cooperación celular y las interacciones entre antígeno, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, inmunoglobulinas, etc. Aquí los linfocitos se transforman frente a un antígeno específico para generar linfocitos con memoria y linfocitos efectores.

La tercera etapa se fundamenta por la acción destructora de células efectoras sobre antígeno (3).

### 3.3 SISTEMA DE COMPLEMENTO

El sistema del complemento es un importante componente soluble del sistema inmunitario innato. Se define como un sistema funcional de unas 30 proteínas del suero que interaccionan entre sí, con la activación de enzimas plasmáticas en forma de cascada, amplificando la respuesta humoral, su activación y fijación a microorganismos, dando lugar a la lisis celular (4).

El sistema de complemento juega un importante papel en modular la respuesta inmune humoral específica. Entre sus funciones están el originar lisis de células, bacterias y virus recubiertos, mediar en el proceso de opsonización y generar fragmentos peptídicos que regulan las características de la respuesta inflamatoria e inmunitaria y también interviene en la regulación de la actividad biológica de las células (3).

Hasta hace muy poco se hablaba de dos rutas de activación del complemento (la clásica y la alternativa), recientemente se ha descubierto una tercera vía, denominada vía de las lectinas.

La ruta clásica puede ser activada por complejos antígeno-anticuerpo o inmunoglobulinas agregadas, La ruta alternativa conecta con el sistema de inmunidad natural o inespecífica, interaccionando directamente con la superficie del microorganismo y la ruta de las lectinas al igual que la ruta alternativa depende de anticuerpos, y por lo tanto pertenece al sistema de inmunidad natural (4).

Las tres rutas comparten las últimas fases, consistentes en el ensamblaje, sobre la superficie del microorganismo, del denominado complejo de ataque a la membrana.

Los componentes de las primeras fases de la ruta clásica y alternativa son diferentes, pero su comparación muestra sus semejanzas estructurales y funcionales. También existen semejanzas entre las proteínas C1 de la ruta clásica y las proteínas recién descubiertas de la ruta de las lectinas. Parece ser que las moléculas implicadas en cada ruta debieron evolucionar por duplicación génica y ulterior diversificación (2).

### **3.4 LINFOCITOS**

Los linfocitos son células importantes del sistema inmune, pueden distinguirse distintos tipos de linfocitos con base en sus propiedades funcionales y las proteínas específicas que expresan, los linfocitos T y B son los responsables de la respuesta inmune específica, se producen en los órganos linfoides primarios a razón de 1000 millones al día, y de allí migran a órganos linfoides secundarios y a espacios tisulares (5).

El linaje de células T y B se origina de un subgrupo de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea o en el hígado fetal, que se destinan a una vía linfoides de desarrollo. Son descendientes de un progenitor asignado de la médula ósea, llamado célula progenitora linfoides, que actúa como precursor común de las células tanto T como B, así como para las células NK y algunas células dendríticas (2).

Los linfocitos maduros que emergen del timo o la médula ósea son mitóticamente inactivos y, aunque potencialmente son capaces de realizar división celular y funciones inmunitarias, aun no se han estimulado para realizar algunas de estas funciones, no obstante, si tales células reciben señales que indican la presencia de una sustancia extraña o un patógeno específico, pueden responder mediante un fenómeno conocido como activación, durante el cual pueden realizar ciclos sucesivos de división celular a lo largo de un periodo de varios días. Algunas de las células descendientes que se generan regresan luego al estado de reposo para convertirse en linfocitos de memoria. Los otros descendientes de un linfocito virgen activado se diferencian en células efectoras, que sobreviven sólo durante unos cuantos días, pero en dicho lapso realizan actividades defensoras específicas contra invasores extraños (3).

#### **3.4.1 Linfocitos B**

Los linfocitos B se definen por su capacidad de producir inmunoglobulinas que pueden quedar unidas a la membrana donde actúan como receptores específicos de antígenos o bien ser secretadas en cuyo caso actuarían identificando y destruyendo antígenos.

Cuando los linfocito B se activan se transforman en células memoria y en células plasmáticas, especializadas en la síntesis y secreción de grandes cantidades de inmunoglobulinas (6).

### **3.4.2 Linfocitos T**

Se caracterizan por poseer receptores específicos para los antígenos, denominados receptores de células T o TCR (con cadenas  $\alpha\beta$ ) los cuales reconocen antígenos unidos a proteínas codificadas por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad o MHC. Fenotípicamente se caracterizan por expresar la molécula CD3 asociada al TCR además de otros marcadores de membrana como CD2 y CD7. Los linfocitos T son los responsables de la respuesta inmune celular jugando un papel fundamental en controlar y desarrollar la respuesta inmune adquirida mediante la producción de citocinas solubles y el desarrollo de linfocitos T citotóxicos (Tc) con una actividad lítica importante de células infectadas por virus o células tumorales (7).

## **3.5 INMUNOMODULACIÓN**

La inmunomodulación es un abordaje terapéutico en el que se intentó intervenir en los procesos de autorregulación y homeostasia del sistema de defensa. La definición de inmunomodulación se refiere a la acción que ejerce la medicación sobre los procesos de autorregulación que dirigen el sistema de defensa inmunitario (8).

Las sustancias inmunomoduladoras tienen la capacidad de estimular o inhibir la respuesta inmune, esto por la necesidad de desarrollar agentes que puedan inhibir o intensificar selectivamente poblaciones o sub-poblaciones de células para la respuesta inmune, tales como: linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células asesinas NK y citotóxicas (CTL), o producir mediadores solubles como las citoquinas y el sistema de complemento (8).

A los inmunopotenciadores se les atribuyen funciones importantes en las inmunodeficiencias de algunos tipos de infecciones virales y bacterianas, especialmente en el tratamiento del cáncer, cuando las radiaciones y los medicamentos anticancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune (8).

A los usos mencionados se une la posibilidad de potenciar la inmunogenicidad de vacunas con antígenos sintéticos, incluidas las de nueva generación, así como la inmunización experimental para obtener antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales; en este último caso, a los inmunopotenciadores se les denomina adyuvantes inmunológicos (8).

En sus mecanismos de acción, los inmunomoduladores pueden actuar específica o inespecíficamente (8).

### **3.5.1 Inmunomoduladores de acción específica**

Ejercen su acción sobre células del sistema inmune, atribuible a la presencia de un antígeno o inmunógeno dado, por lo que hay especificidad selectiva en la acción de estas células para producir una respuesta inmune. La inmunomodulación es selectiva cuando hay estimulación y su resultado significa una inmunorreacción hacia un antígeno o varios, como es el caso de los adyuvantes inmunológicos o las vacunas terapéuticas (8).

### **3.5.2 Inmunomoduladores de acción inespecífica**

Los inmunomoduladores de acción inespecífica son agentes que logran estimular o suprimir la respuesta inmune, sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado (8). Se dividen en 3 tipos, según su acción:

- Tipo I: actúan sobre el sistema inmune normal.
- Tipo II: actúan sobre el sistema inmune inmunodeprimido.
- Tipo III: actúan sobre el sistema inmune funcionalmente normal e inmunodeprimido.

Los inhibidores del complemento son importantes en la inmunomodulación, como ya se mencionó, el complemento aumenta la fagocitosis y la lisis de antígenos; este es un proceso quimioatrayente que eleva la respuesta inmune. El sistema del complemento evoluciona para ayudar en los procesos de defensa de individuos mediante daño directo a los microorganismos invasores y producción de inflamación tisular.

El control regulador estricto de este sistema es de importancia fundamental para evitar la destrucción de los propios tejidos del huésped mediada por el complemento (3).

### **3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA *IN VITRO***

A través de diferentes modelos experimentales se pueden evaluar compuestos químicamente sintetizados o compuestos extraídos de una especie vegetal. Otros ensayos que hacen parte de la batería para evaluar actividad inmunomoduladora son: partes de órganos, cultivos celulares específicos (monocitos, macrófagos y leucocitos, entre otros) y sistemas enzimáticos o de unión a receptores, que se trabajan como modelos *in vitro* (9).

También se realizan ensayos *in vivo* como el de estimulación de la fagocitosis. Debe tenerse en cuenta que la técnica de inhibición del sistema de complemento, como ensayo *in vitro*, tiene la limitación de no poder predecir los resultados que puedan obtenerse en un ensayo *in vivo*, ya que no es posible reproducir completamente las condiciones de un ensayo a otro y la extrapolación de los resultados (9).

El ensayo de inhibición sobre el sistema de complemento hace parte de una batería de ensayos que permiten reconocer si un compuesto químicamente sintetizado o un extracto y/o compuesto de origen vegetal, puede tener actividad sobre este elemento del sistema inmune. Es básicamente un ensayo de tamizaje que permite aportar información acerca de compuestos que posiblemente puedan tener actividad inmunomoduladora. La técnica fue adaptada para su aplicación al ensayo de extractos vegetales (9).

Por otra parte esta técnica solo evalúa uno de los componentes del sistema inmune que es el sistema de complemento (5). Este ensayo *in vitro* está basado en la hemólisis de eritrocitos por el complejo de ataque a la membrana (CAM) generado después de la activación del sistema de complemento por la vía clásica o alterna. El ensayo envuelve medidas espectrofotométricas a una longitud de onda de 405 nm, de la hemoglobina liberada, que refleja el grado de acción lítica por medio de una relación entre la absorbancia de la hemoglobina liberada y el número de eritrocitos lisados. Lo que se cuantifica es el grado de inhibición del sistema del complemento por disminución de la lisis de los eritrocitos, obteniéndose una concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) (9).

### **3.6.1 Ensayos hemolíticos para la valoración de la actividad sobre el sistema de complemento.**

La inhibición de la actividad del Sistema de Complemento se determina mediante la metodología propuesta por Klerx *et al* en 1983, la cual se basa en la hemólisis de eritrocitos de carnero, al activarse este sistema, los eritrocitos actúan como activadores y células blanco. Tras esta activación se produce la lisis de los eritrocitos liberándose la hemoglobina, la cual es medida y utilizada como parámetro para medir la actividad del complemento. Para la vía clásica se emplea eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero y en la vía alterna el ensayo es similar, dependiendo de la lisis de eritrocitos de conejo, se debe inactivar la vía clásica utilizando ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) como agente quelante de calcio (necesario para su activación). Con los datos obtenidos se calcula el porcentaje de inhibición y la  $CI_{50\%}$  de lisis eritrocitaria (que es la concentración de la muestra en investigación necesaria para obtener el 50% de lisis eritrocitaria, bajo condiciones estandarizadas) (10).

### **3.6.2 Ensayos para valorar la linfoproliferación**

La valoración de la linfoproliferación se lleva a cabo por medio de una medición espectrofotométrica directa por un lector de ELISA. Este ensayo está basado en la utilización de la sal de tetrazolio (XTT) para desarrollar un ensayo colorimétrico cuantitativo, el número de linfocitos presentes en cada pozo se correlaciona con la capacidad de reducir el XTT a un producto coloreado y soluble, dicha sal es reducida principalmente por la actividad enzimática mitocondrial presente básicamente en las células vivas. La señal generada depende del grado de activación de las células. Este ensayo puede ser utilizado para medir la linfocinas proliferativa, estímulos mitógeno y la lisis (11).

Los mitógenos son una clase de moléculas que pueden activar de manera inespecífica tanto células T como B. Estas moléculas se unen a las moléculas superficiales de las células T que intervienen en la activación, por ejemplo, TCR y CD2. Existen distintos tipos de mitógenos: lectinas (substancias producidas por plantas), lipopolisacárido de la pared bacteriana, proteína A estafilocócica (12).

Su acción es inespecífica, con efectos mitógenos sobre linfocitos, por lo que se usan para activar estas células en ensayos de proliferación (13).

Los mitógenos más utilizados provienen de cuatro legumbres que han sido purificados y estandarizados. Sus propiedades químicas y biológicas son:

#### 3.6.2.1 Fitohemaglutinina (PHA):

La PHA se obtiene a partir de diferentes variedades de frijol pertenecientes a la especie *Phaseolus vulgaris*. Las potencialidades de la PHA como inmunomodulador se fundamentan en la inducción de la actividad y proliferación linfocitaria *in vitro*; efecto observado *in vivo* solo con dosis excesivas de PHA eritroaglutinante (13)

La PHA comprende 5 glicoproteínas tetraméricas, 2 isolectinas formadas por 2 polipéptidos (L=leucocito y E=eritrocito) en combinaciones L4, L3E1, L2E2, L1E3, E4.1,2. Las subunidades tipo E mayores que las L, son responsables de la eritroaglutinación, pero muestran poca actividad mitogénica o ninguna. Las subunidades L confieren propiedades leucoaglutinantes a la proteína nativa y tienen la máxima actividad estimulante de la mitosis (13).

#### 3.6.2.2 Concanavalina A (Con A):

La concanavalina A (Con A) es una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*. La Con A es un excelente inductor de mitosis en los linfocitos y se emplea también en la preparación de reactivos para identificar glicoproteínas y polisacáridos (14).

La actividad de la lectina se evalúa mediante su capacidad aglutinadora de eritrocitos humanos. La Con A está ligada específicamente a residuos de  $\beta$ -D-glucopiranosas y  $\alpha$ -D-manopiranosas y a glucopolisacáridos y glicoproteínas que tienen tales residuos (14).

### 3.6.2.3. Mitógeno de fitolaca (PWM):

*Phytolacca americana* o pokeweed a demostrado tener actividad mitogénica, se diferencia por poseer muy poca actividad eritroaglutinante, no proviene de legumbre y en el ratón afecta ambos linfocitos T y B. El aminoácido más frecuente es la cisteína, necesita de calcio y manganeso para ejercer su actividad (15).

## 3.7 ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LAS PLANTAS

En la actualidad el uso de plantas no solamente se basa en los conocimientos de la medicina tradicional, ya que del punto de vista que tiene el hombre hacia la terapéutica, ha surgido la necesidad de conocer propiedades, mecanismos de acción y beneficios que ofrece el uso de los extractos de plantas, por lo que se realiza una serie de investigaciones sistemáticas, experimentales y clínicas (16).

En algunos países se han realizado investigaciones que determinan la actividad inmunomoduladora de plantas sobre el sistema del complemento para lo cual han elegido plantas a las que se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias, antipiréticas, antirreumáticas y de uso en enfermedades hepáticas. Estos estudios han concluido que tienen actividad anticomplementaria, es decir que disminuyen la actividad del sistema del complemento, esta acción se puede originar por medio de quelación de  $Ca^{+1}$ ,  $Mg^{+2}$  ó interacciones con los componentes simples de alguna vía del sistema del complemento (16).

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

fenoles, cumarinas, aminoácidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, alcaloides y otros compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (16).

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

Los fármacos herbarios son conocidos por sus propiedades inmunomoduladoras y por estimular de forma generalizada la inmunidad específica y no específica. Muchas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional han demostrado poseer actividades inmunomoduladoras. Algunas de estas plantas estimulan tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral, mientras que otras sólo activan los componentes celulares del sistema inmunitario, es decir, la función fagocítica sin afectar a la inmunidad celular o humoral (16).

Los productos naturales y sus componentes pueden ser una fuente importante de moléculas con propiedades inmunomoduladoras. Sobre esta actividad se han publicado un elevado número de trabajos (9). Algunas plantas que han demostrado tener actividad inmunomoduladora son *Allium savitum*, *Equinacea purpurea*, *Equinacea angustifolia*, *Uncaria tomentosa*, *Hydrastis canadensis*, *Aloe vera* y *Pikorriza kurroa* (9).

La forma más rápida para detectar compuestos inmunoestimulantes *in vivo* es a través de experimentos con modelos de animales infectados o inmunosuprimidos, sin embargo para el estudio masivo de compuestos, los bioensayos *in vitro* son los más adecuados, su costo es bajo y pueden orientar sobre los posibles mecanismos de acción de las sustancias investigadas. La actividad inmunomoduladora *in vitro* se mide a diferentes niveles, desde los efectos sobre partes de órganos, preparación con células enteras como leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, linfocitos; hasta los efectos sobre sistemas enzimáticos y con técnicas de unión de los receptores. Los criterios que se usan para seleccionar los bioensayos son la relevancia e importancia de las funciones o disfunciones efectoras inmunes, sea bajo condiciones normales o patológicas; es decir que puedan estar orientados a la enfermedad (9).

Algunos de los ensayos más utilizados para detectar la actividad inmunomoduladora de extractos son: fagocitosis granulocítica *in vitro*, ensayo de

quimioluminiscencia, ensayo de quimiotaxis, fagocitosis *in vivo*, prueba de aclaración de carbón, ensayo de proliferación linfocítica, ensayo de citotoxicidad inmunoinducida, ensayo de actividad sobre el sistema de complemento *in vitro*, ensayo para la producción del factor de necrosis tumoral (TNF), y prueba de la expresión del antígeno CD69 (9).

En años recientes los productos naturales de plantas, han sido investigados por su potencial acción inmunomoduladora como provenientes de infecciones y neoplasias. La terapia herbaria o fitomedicina utiliza plantas, partes de las plantas o sustancias derivadas de la planta generalmente considerados como complementos de la medicina (17).

Desde la perspectiva de la medicina herbaria occidental, los remedios herbarios que afectan el sistema inmunológico pueden ser clasificados como adaptógenos o inmunoestimulantes, o ambos. Los adaptógenos incluyen las sustancias que permiten aumentar la resistencia del cuerpos agentes tanto físicos, químicos o biológicos (18, 19).

La meta principal de la inmunoterapia es estimular la actividad de células inmunológicas que son las que entran en contacto directo con agentes infecciosos. Los agentes inmunoestimulantes tienen efectos mínimos en la respuesta inmune normal, pero pueden ayudar a rectificar moderadamente la respuesta inmune mediada por células (20).

En el 2004, un grupo taiwanés encontró que el extracto etanólico de *Panax ginseng* incrementaba la expresión de IL-2, IL4 e IL-10 por células de bazo de ratones (23). Otro ejemplo de este diseño experimental es el efectuado por un grupo chino que descubrió que el extracto etanólico acuoso de *Coriolus versicolor* (Yunzhi) que indujo una alta producción de IFN $\alpha$  e IL-8 a las 24 hrs. de incubación de linfocitos de bazo (24).

Entre algunas de las investigaciones más recientes que muestran el tamizaje de plantas por su actividad inmunomoduladoras, se encuentran el realizado en el 2005 en la Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong, por Chan y colaboradores, encontrando que la fórmula herbaria de CKBM compuesta de cinco hierbas medicinales chinas (*Panax ginseng*, *Schisandra chinensis*, *Fructus crataegi*, *Ziziphus jujube* y *Glycine max*) suplementadas con *Saccharomyces cerevisiae* procesada, fue capaz de iniciar la secreción *in vitro* de IL6, IL10, TNF e IFN $\alpha$  por células mononucleares de sangre periférica (21).

Existen numerosos estudios realizados e *in vitro* usando derivados de plantas que presentan propiedades mitógenas. Dentro de los cuales podemos destacar *Silybum marianum* que induce un aumento de la proliferación de linfocitos murinos *in vitro*, junto con un incremento de interferon gamma, IL-4 e IL-10 en los timocitos (25).

Se ha evaluado el efecto inmunomodulador *in vitro*, sobre linfocitos de sangre periférica y timocitos, de los extractos etanólicos de cinco plantas: *S. marianum*, *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis*, *Cichorium intybus* y *Dracocephalum kotschy* (26).

Los resultados obtenidos muestran, que ninguno de los extractos presenta un efecto mitogénico directo, excepto *S. marianum* (100 µg/ml) que muestra un 13% de incremento de la proliferación de los linfocitos a una concentración de 50 µg/ml (26).

### **3.7.1 Investigaciones de algunas plantas inmunomoduladoras.**

3.7.1.1 Coneflower púrpura (*Echinacea purpurea*): Echinacea es natural de la flora silvestre de Norteamérica, la raíz o la parte sobre el suelo de la planta durante la fase floreciente del crecimiento se utilizan medicinalmente para resfriado común, función inmune, infección, gripe, faringitis, rinitis, sinusitis y bronquitis, gingivitis secundaria (enfermedad periodontal), otras como úlceras de la boca, enfermedad de Crohn, Infecciones del oído (recurrentes), vaginitis e infección por hongos (28).

Se piensa que su función está dirigida principalmente hacia mecanismos inmunes no específicos como la actividad fagocítica, activación de macrófagos y la actividad de las células NK (27). En un estudio donde se trataron ratas con extractos de *E. angustifolia* demostraron una producción aumentada de la subclase de anticuerpos específicos, e inmunoglobulina IgG (28).

Entre sus principios activos se encuentran esteres del ácido cafeico (equinacósidos A y B, cinarina, ácido chicórico), aceite esencial (borneol, bornilacetato, D-germacraneno, cariofileno), antocianósidos, trazas casi insignificantes de alcaloides pirrolizidínicos (tusilagina, isotusilagina), resina (conteniendo ácidos grasos, oleico, linoléico, cerótico y palmítico, así como fitosteroles), isobutilamidas y polisacáridos. Se emplea como infusión,

extracto fluido, extracto seco, tintura y jarabe. Sola o asociada a otras plantas que refuerzan o estimulan las defensas del organismo (28).

3.7.1.2 Ginseng coreano (*Panax ginseng*): Algunos botánicos la consideran una materia que ayuda a proteger el cuerpo contra la enfermedad, como un inmunoestimulante, aumenta la actividad antitumoral, mejora la actividad cardiovascular y tiene actividad antioxidante, entre otras (29,30).

Las membranas de los linfocitos circulantes tienen un volumen de fosfolípidos alto por lo cual son muy vulnerables al daño oxidativo (31). En estudios *in vitro*, se observó que activa a los macrófagos para producir intermediarios de nitrógeno reactivo; en otro estudio se observó que reforzó la actividad de los macrófagos en ratones infectados con *C. albicans* (32).

Son usados como adaptógenos (ayudan al cuerpo a adaptarse al estrés y como tónico general, el ginseng coreano contiene sustancias Rg1 ginsenósidos que producen un efecto estimulante, otras sustancias que posee esta son, panaxósidos, hierro, germanio, calcio, vitaminas A y E. El efecto estimulante del ginseng coreano se nota cuando el organismo está estresado. A la vez que el uso primario del ginseng es como adaptógeno y tónico general se usa tradicionalmente para varias condiciones incluyendo: síndrome de fatiga crónica, fatiga mental y física, ansiedad, depresión, pérdida de memoria en el anciano, diabetes, colesterol alto, síndrome de abstinencia en drogas, alcoholismo, impotencia y trastornos eyaculatorios (33).

Los ginsenósidos (Rg1) son los ingredientes activos del ginseng coreano. Se ha visto además que restaura el glucógeno muscular y lleva el adenosintrifosfato (ATP) a niveles normales. Algunas investigaciones mostrarían su acción en los sistemas nervioso central y circulatorio, aumentando las defensas y la acción del sistema glandular (33).

3.7.1.3 Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*): Pertenece a la familia de Polypodiaceae, con sus sinónimos de *P. calahuala*, *P. aureum*, *P. aereolatum*, *P. decumanum*, *P. leuctomos*, es un helecho epífita que posee un rizoma rastrero y sinuoso, nativa de Centro América que se extiende hasta Sur América en alturas de 1200-2200 msnm. Crece

silvestre en tronco de palmas, árboles de gran humedad a la sombra. Los rizomas se obtienen por recolección en los bosques de crecimiento silvestre (40).

Entre sus usos medicinales, se destaca que el rizoma es utilizado para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis), respiratorias (asma, tos, tos ferina) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, usado en el tratamiento de parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales (cálculos, hidropesía), tópicamente se utiliza para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quemaduras, soriasis y eccemas (40).

El *P. leucotomos*, es un tipo de helecho que crece en las regiones tropicales y subtropicales de América. Tiene un largo historial de uso por la medicina tradicional en Honduras para curar toda una serie de problemas de salud y especialmente las inflamaciones de la piel. Sus efectos fotoprotectores han sido demostrados en estudios con animales y en el ser humano (34).

Estudios celulares y en el animal demostraron que tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores. Estos explican de qué forma el *P. leucotomos* protege la piel de los efectos nocivos de la exposición a los rayos ultravioletas del sol: Elimina los radicales libres y las especies oxigenadas reactivas, en concreto el anión superóxido, inhibe la depleción de las células de Langerhans; reduce la cantidad de células quemadas por el sol, protege el ADN al inhibir la formación de dímero de pirimidina de ciclobitano (34).

Sus rizomas se encuentran compuestos de azúcar, aceites esenciales, mucílago, almidón, nitrato de potasio, calagualina, glicorrizina (ácido glicoretínico), polipodina, aceites grasos, taninos, esteroides (ecdiserona, polipodaureína), un colorante rojo, principios amargos, resinas. Por fraccionamiento bioguiado, se aisló del extracto metanólico la adenosina como uno de los principios inmunomoduladores (40). Mientras que la saponina calahualina, aislada de su rizoma tiene actividad antitumoral, la decocción del rizoma produce efecto diurético moderado en ratas. El extracto acuoso administrado en ratones, prolonga la supervivencia de aloinjertos cutáneos, sugiriendo una actividad inmunosupresora (40). En estudios de propiedades *in vitro* el efecto medicinal del extracto

de calaguala como inhibidor inmunológico, reporta la probabilidad que la adenosina es el componente bioactivo responsable de sus propiedades terapéuticas (35).

Varios estudios demostraron que el extracto de *P. leucotomos*, reduce la gravedad de la insolación, ayuda a prevenir el envejecimiento cutáneo y disminuye el riesgo de padecer cáncer ligado a las radiaciones ultravioletas, en los sujetos afectados de fotodermatosis idiopáticas, disminuye las reacciones cutáneas y los síntomas subjetivos; disminuye los efectos secundarios de la PUVA, inhibe la acción de las citocinas, factores inmunitarios que se encuentran sobre todo en las enfermedades autoinmunes (34).

3.7.1.4 Gengibre (*Zingiber officinale*): Es un rizoma que se usa ampliamente en el mundo como una de las especias importantes e hierbas tradicionales. Se ha informado que extractos de jengibre presentan algunas actividades farmacológicas incluso antiinflamatorias, antitumorales y antioxidativas. Un estudio realizado en china evaluó los efectos del aceite de jengibre sobre la respuesta inmune tanto *in vivo* como *in vitro* en ratones, en donde los resultados sugieren que el aceite de jengibre tiene influencia sobre la respuesta inmune mediada por células, la proliferación de linfocitos T y puede ejercer efectos sobre un número de condiciones clínicas como inflamación crónica y enfermedades autoinmunes (36).

3.7.1.5 Ajo (*Allium sativum*): Posee actividad inmunomoduladora, antioxidante, hipolipemiente, antiaterogénica, antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica y anti-carcinogénica. Todas estas actividades se atribuyen principalmente a los compuestos azufrados, que son los principios activos más destacables de esta droga, aparte de estos componentes en el bulbo de ajo también se encuentran sales minerales (selenio), azúcares, lípidos, aminoácidos esenciales, saponósidos, terpenos, vitaminas, enzimas, flavonoides y otros compuestos fenólicos. Estudios *in vitro* e *in vivo* han evidenciado la capacidad del ajo tanto para estimular la proliferación de linfocitos y la fagocitosis de macrófagos como la liberación del interferon-gamma. También aumenta la actividad de las células NK y muestra actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria, se considera que el agente principal es la alicina, que es activa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, aunque en esta acción parece que también contribuyen los ajoenos y el trisulfuro de dialilo. Su efecto antifúngico es especialmente eficaz frente a *Candida* y otros hongos (37).

### 3.8 ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE *P. alliacea* y *S.domingensis*

*Petiveria alliacea* (Apacin) pertenece a la familia Phytolaccaceae. Es una planta americana aromática, con un hábitat que abarca desde la Florida, México y las Antillas hasta gran parte de Sudamérica. Las actividades biológicas que presenta la planta abarcan el campo de la infectología, inmunología y oncología, su aceite esencial ha demostrado acción insecticida contra ejemplares adultos de algunas variedades de mosquitos y actividad repelente contra la polilla de ropa (38). Su extracto acuoso demostró poseer efecto inmunomodulador aumentando la producción de IFN $\alpha$  en ratones tratados (22).

Según los estudios previos *P. alliacea* en su estado silvestre ha demostrado una actividad inmunomoduladora en sus extractos etanólicos de hoja y raíz, específicamente, una actividad inhibitoria de la vía clásica de complemento con un CI<sub>50</sub> de 5  $\mu$ g/ml y 14  $\mu$ g/ml de hoja y raíz respectivamente; mientras que se mostró una actividad estimulante de la vía alterna del complemento (39).

El extracto hexánico de tallos y hojas, produjo inmunoestimulación a una concentración de 0.5 mg/mL al incrementar el índice fagocitótico de granulocitos humanos de 4.0-6.2, mientras que una fracción obtenida con ciclohexano-metanol produjo un valor máximo de 5.6; uno de los compuestos inmunoestimulantes del extracto es el dibenciltrisulfuro, tanto este como el extracto causaron un incremento en el peso del timo y de las placas de Peyer de ratones (43).

*Smilax domingensis* (zarzaparrilla), en medicina popular el rizoma es usado por sus propiedades estimulantes, diuréticas, diaforéticas y depurativas de la sangre. El cocimiento de las raíces se utiliza para combatir la sífilis, herpes, lepra, tina, eccema, acné nervioso y urticaria. La infusión de las hojas y de los tallos tiernos se usa para contrarrestar las úlceras de la boca, es un buen coadyuvante en el tratamiento de reumatismo, artritis, gota y acumulaciones de ácido úrico. En dosis elevadas destruye cálculos renales y evita la diabetes (40).

En estudio de campo se determinó que la zarzaparrilla comercialmente se obtiene por medio de recolección silvestre (61.39%) y un 7.92% de cultivos y se atribuyen propiedades medicinales para atacar problemas de circulación, para purificar la sangre y afecciones renales (46). En la actualidad, las plantas medicinales más importantes de Guatemala, por su volumen comercializado y por el valor económico que implican, son los rizomas de zarzaparrilla (*S. domingensis*), las cuales son un recurso de la flora nativa de Mesoamérica con larga tradición de uso y de explotación como medicamento y materia prima industrial (47).

En estudios previos realizado con material silvestre de dicha especie, se evaluó la actividad antiinflamatoria, analgésica e inmunomoduladora por ensayos *in vivo* e *in Vitro*, se identificaron los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos y las fracciones, y se determinó la citotoxicidad *in vitro*, así como la toxicidad aguda y sub-aguda en animales de experimentación, obteniendo como resultados que el rizoma de *S. domingensis* inhibe la vía alterna (CI<sub>50</sub> de 12.15 µg/mL). Se determinó que ninguno de los extractos etanólicos de *S. domingensis* presenta actividad analgésica ni actividad antiinflamatoria aguda (47).

## 3.9 MONOGRAFÍAS DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

### 3.9.1 *Petiveria alliacea* L.

3.9.1.1 Familia                    *Phytolaccaceae*

3.9.1.2 Sinonimia:                *Petiveria alliacea*

3.9.1.3 Nombre (s) común (es): Mapurite, anamú, apacín, mucura, tipi, verbena hedionda, zorrillo, hierva de gallinita (48, 49).

3.9.1.4 Descripción:

Es una planta americana aromática, de unos 30 a 100 cm de alto, tallo erecto, poco ramoso, pubescente; hojas simples, alternas, casi lampiñas, por lo general elíptica y granulosa hacía el pecíolo, limbo oblongo u ovalado, de 5-15 cm de largo, verde brillantes. Inflorescencias en racimos delgados, 10-35 mm de largo, poco floreadas; flores subsésiles

o en cortos pedicelos, sépalos blanco-verduzcos, oblongo-lineares, 3-4 mm de largo. Frutos comprimidos en el raquis del racimo, angostamente cuneados y 8 mm de largo (50,42).

#### 3.9.1.5 Distribución geográfica:

Áreas tropicales de Centro y Suramérica, Caribe y África. En Guatemala se ha descrito en Alta y Baja Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Petén, Retalhuleu, Santa Rosa, Sacatepéquez, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa (51).

#### 3.9.1.6 Fitogeografía:

Crece de forma silvestre en bosques húmedos y terrenos disturbados desde Texas a Florida meridional y hasta las regiones tropicales y templadas de México, Centroamérica, Sudamérica y el Caribe (52).

#### 3.9.1.7 Hábitat:

Es característica de suelos húmedos e inundables considerando los suelos de moderado a mal drenado (52).

#### 3.9.1.8 Clima:

Crece en bosques tropicales húmedos y muy húmedos así como en bosques secos que muestran una precipitación entre 1,500 y 3,500 mm anuales (52).

#### 3.9.1.9 Suelos:

En Panamá es común encontrarla a la orilla de ríos en suelos aluviales e inundables por cortos períodos de tiempo y en plantaciones en suelos pedregosos con alto contenido de arcilla y pH ácido e incluso en curso de agua en riachuelos y quebradas.

#### 3.9.1.10 Requerimientos ambientales:

Crece en manchones en altas poblaciones como sotobosques y se reproducen durante todo el año, pero alcanza su máxima floración de octubre a diciembre. Presenta gran capacidad de rebrote después de cortada, debido a la eliminación de la dominancia apical. A pleno sol su crecimiento es reducido y presenta una clorosis amarillo-blanquecina. Las hojas se tornan ásperas y su tamaño es reducido (52).

#### 3.9.1.11 Cultivo

- Propagación sexual:

Un gramo de semilla contiene un promedio de 60 unidades. Pruebas de germinación, para la obtención de plantones a raíz desnuda en camas aéreas y usando como sustrato tierra aluvial, las semillas inician la germinación a partir del tercer día de una forma no uniforme produciendo plantones de 15-20 cm de alto a partir de los 60 días después de la siembra. La preparación y acondicionamiento del suelo se ha hecho con azada manual y con la incorporación de gallinaza fermentada en dosis de 3 kg/m<sup>2</sup> en semi-sombra natural en los márgenes de quebradas. En suelos aluviales utilizando 40 cm entre líneas en bloques de 6 surcos con 30 semillas/m lineal se obtuvo buena germinación. Con longitud variada se acondicionó el terreno con azada solo en el surco y se incorporó gallinaza en dosis de 3 kg/m<sup>2</sup> en semi-sombra en las márgenes de las quebradas (52).

- Propagación asexual

Se multiplica por esqueje con gran facilidad. Se ha evaluado la parte superior, media e inferior del tallo, lográndose un porcentaje de peque superior al 80%. La sección que mejor resultado ha tenido es la sección media e inferior por la velocidad de crecimiento y vigor de la planta (52).

La preparación es manual. Se inicia con el corte de maleza con machete procurando dejar sobre la superficie los residuos para controlar la penetración de la luz solar que active la germinación de semillas de maleza y reactive el rebrote (52). Se aplica fertilizante químico 12-24-12 en dosis de 227 kg/ha al inicio del establecimiento en el campo definido y

posteriormente a los tres meses. La aplicación de este fertilizante estimula el desarrollo inicial y una revitalización de las plantas hasta obtener buen desarrollo foliar lo cual limita la competencia de las malezas (52).

Se siembra en bloques utilizando sombra de arboles en los márgenes de ríos en suelos de aluvión, ha sido buena ya que las hojas presentan mayor longitud, ancho y una mejor coloración. Limpieza y mantenimiento del cultivo es de vital importancia especialmente en la etapa de establecimiento e inicio de crecimiento vegetativo que las limpiezas se realicen con menor frecuencia (43). En un cultivo de 9 meses en dos parcelas de 2 \*4 m se logró un rendimiento promedio de 12.52 kg/m<sup>2</sup> de peso húmedo de raíces de materia fresca. La altura promedio de cada individuo fue entre 0.99 a 1.18 m El rendimiento logrado es de 3.94 kg/m<sup>2</sup> de raíces secas. No se calculó el rendimiento de partes aéreas (52).

#### 3.9.1.12 Usos medicinales atribuidos

Aunque tradicionalmente se le adjudican muchas propiedades, sus principales efectos son: analgésico-antipirético, antiinflamatorio, anestésico, antiespasmódico, antidiapéptico, hipoglucemiante, inmunoestimulante (antitumoral) y antimicrobiano (hongos, bacterias y parásitos). Los usos etnomédicos de la planta contemplan fundamentalmente sus acciones como analgésico, antiinflamatorio (sobre todo en la artritis y gastritis) e hipoglucemiante y para el tratamiento del cáncer (53,54).

#### 3.9.1.13 Farmacología

- Experimental:

Se ha demostrado la actividad antimalárica frente a cepas de *Plasmodium falciparum*, infecciones dermatomucosas (forúnculos y tiñas) (18-19); así mismo se ha reportado actividad antibacteriana de los extractos etanólicos al 50% contra varios microorganismos gram negativos, y extractos acuosos activos como antimicótico de varios hongos patógenos de las plantas, como *Epidermophyton floccosum*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida albicans* (22).

*P. alliacea* posee actividad inmunoestimulante, antiinflamatoria, antitumoral. Varios estudios clínicos han demostrado su acción antileucémica y antitumoral; En 1993 un estudio demostró que estimula la producción de linfocitos e interleucina 2 en ratones. Varios estudios clínicos han demostrado su acción antileucémica y antitumoral, probablemente debido a sus propiedades inmunostimulantes. En un estudio realizado en 1993, un extracto acuoso de esta planta demostró que estimula la producción de linfocitos e interleukina 2 en ratones.

Otro estudio del mismo año en ratones demostró que el extracto de *P. alliacea* aumenta la actividad de los linfocitos NK en un 100% y estimula la producción de Interferón, Interleukina 2 e Interleukina 4 (60).

En un estudio realizado para determinar si existe actividad antiinflamatoria por vía oral en extracto acuoso liofilizado de la planta en dosis de 100 mg / kg de peso por vía oral en ratas, en los modelos experimentales de pleuresía por carragenina, granuloma por algodón e involución del timo por adrenalectomía no se encontraron diferencias significativas entre los controles y los grupos tratados, lo que hace pensar que la acción antiinflamatoria está dada en extractos hidroalcohólicos de la raíz y no de las hojas en esta especie (43).

- Clínica:

El extracto metanólico de la raíz ha demostrado actividad profiláctica en casos de enfermedad hepática; mientras que el extracto de hoja tiene la actividad hipoglicemiante; este efecto se debe a que contiene un fosfoglicano endógeno que ejerce un efecto similar a la insulina, mejorando el control de la glicemia (45).

#### 3.9.1.14 Sustancias activas:

La planta entera contiene numerosas sustancias activas, entre las que figuran: alcaloides (alantoína, N-metil-4-transmetoxiprolina), esteroides (beta-sitosterol), triterpenos (isoarborinol, acetato de isoarborinol, cinamato de isoarborinol y alfa-friedelinol), derivados sulfurados ( bencil-2-hidroxi-5- etil-trisulfuro, dibencil trisulfuro), flavonoides (astilbina, engeletina, leridal, leridol, leridol-5-metil éter, miricitrina), compuestos inorgánicos (nitrato de potasio), lípidos (ácido lignocérico, lignocerato de lignocerilo, ácido linoleico, ácido

nonadecanoico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico), derivados bencénicos (benzaldehído, ácido benzoico), alcanos (alcohol lignocerílico), carbohidratos (pinitol), taninos, polifenoles y bencil-2-hidroxi-5-etil-trisulfuro, todos los cuales se encuentran presentes en las hojas y tallos jóvenes de la planta (46-48).

#### 3.9.1.15 Toxicología:

En relación con los estudios toxicológicos puede plantearse primeramente lo citado en la Farmacopea caribeña, bibliografía considerada como oficial por el CECMED en el caso de los medicamentos herbarios (48).

La administración de los extractos etanólico y acuoso de partes aéreas de la planta por vías intraperitoneal, intramuscular e intratecal (intrarraquídea) en ratones albinos, produjo signos de toxicidad en cuanto a la supervivencia; pero el suministro oral del extracto de raíz fue muy poco tóxico en ratas. El extracto hidroetanólico de raíz (1 mg del cual equivaldría a 7,7 mg de raíz seca en contacto local con la piel de roedores) no origina reacción de irritabilidad durante los 15 días sucesivos a su aplicación (49).

La DL<sub>50</sub> por vía intraperitoneal en el roedor es de 1 673,11 mg/kg y la decocción no produce genotoxicidad sobre las células germinales del ratón macho (45). Las infusiones de la hoja y raíz no son aparentemente tóxicas en dicho animal, administradas en dosis de 5 000 mg/kg. Por otra parte, se analizó la gastrotoxicidad de la planta con el extracto hidroalcohólico de la raíz y se obtuvo una toxicidad baja, sin efecto ulcerógeno en la membrana de la mucosa gástrica.

### 3.9.2 *Smilax domingensis* Willd.

3.9.2.1 Familia: Smilacaceae

3.9.2.2 Sinonimia: *Smilax parvifolia* Sessé et Moc.  
*Smilax microscola* (B. L. Rob.) Killip et Morton  
*Smilax domingensis* Willd. var. *microscola* B. L. Rob.  
*Smilax caudata* Lundellii Killip & Morton  
*Smilax grandifolia* Regel  
*Smilax lanceolata*

3.9.2.3 Nombre(s) común(es): Cocolmecca, cuculmecca, bejuco de la vida, palo de la vida, diente de chucho (38).

3.9.2.4 Descripción:

El género *Smilax* son bejuco leñosos o herbáceos, dioicos, trepando por zarcillos pareados; es un género complejo y poco estudiado. En Mesoamérica existen unas 26 especies y en Guatemala al menos 12 especies, de las cuales *Smilax domingensis* es nativa de México y Centro América y se usa indistintamente con fines medicinales (38).

Tiene ramas inferiores firmes, robustas, cilíndricas, estriadas, espinas fuertes, glabras o pilosas; ramas superiores sin espinas, peciolos de 1-2.5 cm de largo, articulados; rizoma leñoso, intenso color rojo, raicillas alrededor. Hojas oblongo-lanceoladas, verde-café; inferiores 27 cm de largo; superiores más pequeñas, agudas, ocras a la base, pedúnculo estaminado, prianto segmentado, anteras cortas. Pedúnculo de 7-10 mm de largo; bayas globosas, 4-6 mm de diámetro, negro-azuladas (38).

3.9.2.5 Distribución geográfica:

Es nativa de bosques húmedos hasta 1,300 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Izabal, Petén, San Marcos y Santa Rosa (38).

3.9.2.6 Fitogeografía:

Se distribuye de México a Panamá y las Antillas. En Guatemala se encuentran poblaciones dispersas en regiones montañosas (52).

3.9.2.7 Hábitat:

En Guatemala crece en bosques o matorrales húmedos, desde cerca del nivel del mar hasta los 1,200 m. En Centro América se distribuye en bosques húmedos, montanos y premontanos a una elevación de 0-1800 msnm. En Costa Rica no sobrepasa los 800 msnm (52).

#### 3.9.2.8 Altitud:

En Guatemala de 0-1,200 msnm, en altitudes de 1,300-1,600 msnm se encuentra una especie muy similar *S. kuntii* (52).

#### 3.9.2.9 Clima:

De acuerdo con el sistema de clasificación de zonas de vida de Holdridge en Guatemala crece en bosque húmedo subtropical templado, bosque húmedo subtropical cálido y bosque muy húmedo subtropical cálido. Temperatura promedio de 20-30°C y precipitación de 1,000-2,500 mm anuales distribuidos de mayo a octubre, aunque en Peten el régimen de lluvias es de abril a diciembre, con humedad relativa de 75-85% (52).

#### 3.9.2.10 Suelos:

Suelos arcillos pedregosos con presencia de materia orgánica (52).

#### 3.9.2.11 Requerimientos ambientales:

En cultivo de 0 a 1000 msnm en climas cálido húmedos. Del análisis físico-químico de cinco suelos, efectuado en áreas donde crece la zarzaparrilla, se encontró que tienen una textura franco arenosa a franco arcillosa, algunas veces con problemas de pedregosidad principalmente aquellos de la boca costa; contienen en promedio 12% de materia orgánica; pH de 5.8-6.6; fósforo bastante bajo de 0.01-4.55 mg/kg; potasio de 28-150 mg/kg; con relación calcio/magnesio disponible adecuada (6.4:1 en promedio); capacidad de intercambio catiónico de 27.2-36.09 y porcentaje de saturación de bases de 45.9 en promedio (52).

#### 3.9.2.12 Cultivo

- Propagación sexual:

La forma más adecuada de reproducirla es a partir de semilla. Para esto es importante conocer la fenología de la especie. Los frutos deben recolectarse en la época

en que las plántulas los botan al suelo, lo que ocurre de acuerdo con la localidad entre los meses de noviembre a febrero (52).

Se deben identificar las plantas hembra en producción en áreas silvestres y de preferencia colocar una manta en el área donde caerá la semilla y recolectarla lo más fresca posible. El tiempo de viabilidad de la semilla aún no se conoce con certeza, para la siembra debe seleccionarse procurando que esté libre de manchas de hongos provocadas por el exceso de humedad (52).

La semilla se cubre con 1-2 cm de suelo de la misma cama germinadora desmenuzada. Después se cubre con paja para evitar daño con riego o las gotas de lluvia, y para mantener un microambiente adecuado para la germinación. Para el establecimiento de la siembra es recomendable aplicar materia orgánica debidamente descompuesta en el fondo del hoyo a razón de 0.9 kg por cada uno. Para establecer un plan de fertilización deben considerarse los resultados del análisis del suelo (52).

En condiciones de manejo se puede obtener un rizoma a partir de los 4-5 años, mientras que su crecimiento en bosque sin manejo puede alargarse hasta los 15-20 años. Los últimos trabajos indican que la concentración de ingredientes activos es mejor a partir de los siete años. El manejo de la zarzaparrilla de esta manera puede convertirse en un subproducto más del sistema agroforestal, con lo cual se está dando mayor valoración a los productos del agrosistema (52).

La cosecha se lleva a cabo cuando las plantas tienen 6 o más años bajo manejo, en condiciones silvestres las plantas se llevan más tiempo en desarrollar un rizoma suficientemente grande como para que valga la pena cosechar la planta. Por lo tanto, el manejo es importante para tener plantas comerciales en menor tiempo, una vez extraído el rizoma se procede a eliminarle las raíces. Posteriormente se lava el rizoma con un cepillo para eliminar la tierra (52).

#### 3.9.2.13 Usos medicinales atribuidos:

El cocimiento del rizoma es de uso medicinal en Centro América. Por vía oral se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (diarrea, dolor de estómago,

inapetencia), hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores. La decocción se aplica tópicamente para tratar diversas afecciones dermatomucosas (alergia, eczema, tinea, psoriasis). Se atribuye propiedad antiinflamatoria, antifúngica, antiprurítica, antirreumática, antiséptica, cicatrizante, desinflamante, estimulante, diurética, diaforética, depurativa, sudorífica y tónica (40)

#### 3.9.2.14 Farmacología:

- Experimental:

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de la raíz de *S. domingensis* es activa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Streptococcus pyogenes*, pero inactiva contra *Vibrio cholerae*. Estudios del espectro de inhibición bacteriana en 20 cepas provenientes de pacientes demuestran que inhibe el 85% de cepas de *P. aeruginosa*, 80% de *S. typhi* y 70 % de *S. aureus*.

Estudios antifúngicos demuestran que la decocción y extracto metabólico de *S. domingensis* son activos contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parpsilosis* y *Candida stellatoidea* (CIM= 1-2 mg/ml). La decocción es activa contra *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton mentagrophytes* (40).

Estudios farmacológicos en ratas demuestran que la decocción de raíz y rizoma de *S. domingensis*, *S. regelii* y *S. spinosa* tienen actividad diurética en ratas comparable con el fármaco de referencia (hidroclorotiazida). La decocción del rizoma de *S. domingensis* tiene cierta actividad inmunomoduladora en ratones medida por un aumento en la población de linfocitos y en los títulos de anticuerpos séricos (40).

- Clínica:

Estudios clínicos con 50 pacientes con vaginitis por *C. albicans* demuestran que los óvulos vaginales de tintura del rizoma de *S. domingensis* se comporta en forma similar al fármaco de referencia (Nystatina). En otro ensayo se probó una crema a base de tintura de *S. domingensis* en 76 trabajadores de dos industrias de alimentos que presentaban pie de

atleta, en todos se confirmó una infección dermatofítica por KOH y cultivo y se demostró una mejoría clínica similar al fármaco de referencia (Tolnaftato) después de 15 días de tratamiento, aunque no se demostró negativización al examen con KOH o cultivo (40).

Estudios en Alemania demuestran que una preparación de zarzaparrilla aumenta la excreción urinaria de ácido úrico, resultando en una disminución del 30% de los niveles sanguíneos. Otros estudios demuestran que el extracto acuoso es beneficioso en el tratamiento de eczema y psoriasis. En Marruecos se han tratado exitosamente pacientes con lepra usando una combinación de extracto de *Smilax ornata* y una terapia con dapsona (40).

#### 3.9.2.15 Sustancias activas:

El tamizaje fitoquímico de *S. domingensis* indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esferoidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas. Se han aislado agliconas esferoidales (parillina, sarsasapogenina, smilagenina),  $\beta$ -sitosterol, tigmasterol, ácido sarsápico; otros constituyentes son polinastanina, ácido paroapárico resinas aceites, ácidos grasos (palmítico, esteárico, behénico, oléico, linoléico); contiene sales minerales que incluye óxido silícico (1.2%), aluminio (0.4%), calcio (0.4%), magnesio (0.3%), potasio (1.2%) y cloro (0.4%) (62).

#### 3.9.2.16 Farmacognosia:

La materia médica son raíces y rizoma secos. Microscópicamente son manojos de 60-70 cm de largo, arrugas longitudinales, color rojo-café, fractura de corteza corta con un centro fibroso; corteza blanco-café, xilema amarillo lignificado, zona parenquimatosa central cálida; sin olor, sabor amargo. Microscópicamente es un polvo rojo-café, inodoro, consistente de células parenquimatosas rectangulares con gránulos esferoidales de almidón, hasta 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, gránulos poliédricos; exodermis de dos capas engrosadas, paredes amarillentas; células de hipodermis lignificadas; xilema de vasos y fibras lignificados con engrosamientos espirales. La materia médica no debe contener más de 10% de ceniza, 4% de ceniza insoluble en ácido y no menos de 10% de extraíbles solubles en ácido (40).

### 3.9.2.17 Indicaciones terapéuticas:

Por su actividad antirreumática, antiinflamatoria y diurética está indicado su uso oral para el tratamiento de artritis reumatoide, reumatismo crónico, lepra y disuria. Se recomienda administrar tres veces al día un dosis de 1-4 g en decocción, 8-15 ml de extracto líquido en alcohol al 20% con glicerol al 10% o 2-5 ml de tintura 1:10 en alcohol 35% (62). Por su actividad antifúngica, antiprurítica, cicatrizante y desinflamante se recomienda su uso tópico en el tratamiento de psoriasis, eczema, tinea y otras afecciones de la piel, en forma de tintura, ungüento o pomada. Por su actividad antiinflamatoria, antifúngica y antiséptica puede combinarse con encino, guayaba, hierba del cáncer, llantén, nance y quilete (40).

### 3.9.2.18 Toxicología:

La decocción de raíces de *S. domingensis* tiene una  $DL_{50}$  por vía oral en ratones mayor de 30 g/kg. La administración aguda (0.5-3.0 g/kg) del extracto de *S. regelii* no produce efectos tóxicos en ratones; la administración crónica (100 mg/kg durante 90 días) tampoco produjo síntomas de toxicidad ni cambios sanguíneos sugestivos de toxicidad. En dosis inusualmente grandes puede causar daño, aunque está aprobado su uso como alimento por el FDA. La  $DL_{50}$  de la parillina cristalizada en ratones es de 10 mg/kg administrada por vía intraperitoneal y 30 mg/kg por vía oral (40).

## 4. JUSTIFICACIÓN

Unas de las principales especies vegetales originarias de Centroamérica que han demostrado tener actividad inmunomoduladora y que no han demostrado toxicidad son: *Petiveria alliacea* y *Smilax domingensis*, aunque la información disponible proviene de material vegetal silvestre.

Según estudios previos *P. alliacea*, en su estado silvestre ha mostrado una actividad inmunomoduladora en sus extractos etanólicos de hoja y raíz, específicamente, una actividad inhibitoria de la vía clásica de complemento con un CI<sub>50</sub> de 5 µg/ml y 14 µg/ml de hoja y raíz, respectivamente; mientras que se mostró una actividad estimulante de la vía alterna del complemento (36). De igual manera estudios previos realizados con material silvestre de *S. domingensis*, se evaluó la actividad antiinflamatoria, analgésica e inmunomoduladora por ensayos *in vivo* e *in vitro*, se identificaron los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos y las fracciones, y se determinó la citotoxicidad *in vitro*, así como la toxicidad aguda y sub-aguda en animales de experimentación. Obteniendo como resultados que el rizoma de *S. domingensis* inhibe la vía alterna (CI<sub>50</sub> de 12.15 µg/mL). Se determinó que ninguno de los extractos etanólicos de *S. domingensis* presenta actividad analgésica ni actividad antiinflamatoria aguda (38).

A partir de los hallazgos presentados en los estudios anteriores que demuestran la actividad inmunomoduladora de *P. alliacea* y *S. domingensis* en su estado silvestre, se pretende con este estudio determinar si los extractos de dichas plantas en estado cultivado mantienen su actividad inmunomoduladora pues no se ha realizado estudios que indiquen que al someterlas a un proceso en donde se lleva control de sus requerimientos ambientales, siembra, conservación, fertilización y cosecha, pierdan, mantengan o aumente su actividad inmunomoduladora; para lo cual se evaluará la actividad inmunomoduladora a través de ensayos hemolíticos y de linfoproliferación, haciendo uso de extractos etanólicos y acuosos de diferentes órganos de dichas plantas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 GENERAL:

Demostrar la actividad inmunomoduladora sobre el sistema de complemento y la linfoproliferación por extractos de dos especies de plantas cultivadas de uso medicinal en Guatemala.

### 5.2 ESPECÍFICOS:

- 5.2.1 Obtener a partir de material cultivado de *P. alliacea* y de *S. domingensis*, extractos etanólicos y acuosos de diversos órganos de dichas plantas, para evaluar su actividad.
- 5.2.2 Confirmar la acción inhibitoria de la linfoproliferación de los extractos etanólicos de rizoma y hoja de *S. domingensis* en material cultivado.
- 5.2.3 Evaluar la actividad de los extractos etanólico y acuoso de hoja y raíz de *P. alliacea* sobre poblaciones de linfocitos.
- 5.2.4 Confirmar la acción inhibitoria sobre la vía clásica del sistema de complemento de los extractos etanólicos del rizoma de *S. domingensis* y de las hoja y raíz de *P. alliacea*.
- 5.2.5 Confirmar la acción estimulante sobre la vía alterna del sistema de complemento de los extractos etanólicos de hoja y raíz de *P. alliacea*.

## 6. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos de los diferentes órganos de *P. alliacea* y *S. domingensis*, poseen actividad inmunomoduladora *in vitro*.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 UNIVERSO DE TRABAJO**

Material vegetal de dos especies de plantas de uso medicinal cultivadas en Guatemala, que han mostrado actividad inmunomoduladora.

### **7.2 MUESTRA**

Extractos etanólicos y acuosos de hoja y raíz de *P. alliacea* y de hoja, rizoma y fruto de *S. domingensis*.

### **7.3 RECURSOS**

#### **7.3.1 Recursos Humanos**

7.3.1.1 Asesor: Licenciado Armando Cáceres

7.3.1.2 Investigadores: Anita Yolanda Teo Ochaeta  
Nancy Ivonne Pichardo González

#### **7.3.2 Recursos Institucionales**

7.3.2.1 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamento de Citohistología, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.3.2.2 Laboratorio de Productos Naturales, Farmaya, S.A

7.3.2.3 Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

#### **7.3.3 Recursos Materiales**

7.3.3.1 Equipo

Autoclave  
Balanza Analítica  
Campana de flujo laminar  
Congelador  
Centrifuga  
Hemocitómetro de Neubauer  
Incubadora  
Lector de ELISA  
Refrigeradora  
Espectrofotómetro

#### 7.3.3.2 Materiales

Placas estériles de 96 pozos, fondo plano con tapadera  
Placas estériles de 96 pozos, fondo en U con tapadera  
Pipetas de 10  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$   
Pipetas Pasteur  
Tubos de ensayo  
Tubos Eppendorf de 0.5 y 2.0 ml  
Tubos de 50 ml.

#### 7.3.3.3 Reactivos

Extractos etanólicos de cada planta  
Mezcla de suero humano normal (MSH)  
Mezcla de suero humano inactivado  
Solución salina  
Agua destilada  
Agua desmineralizada  
Solución Alsever  
Eritrocitos de conejo y de carnero  
Anticuerpo contra eritrocitos de carnero (Amboceptor)  
Amortiguador salino de veronal concentrado 5 veces (VSB), como solución madre  
VSB<sup>^</sup> (no aditivos)  
VSB+2 (0.5mM de Mg<sup>+2</sup> y 0.15 mM de Ca<sup>+2</sup>)  
EGTA-VG (2.5 mM de Mg<sup>+2</sup> y 8mM de etilenglicol-bis(beta-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA)).

## 7.4 PROCEDIMIENTO

Se realizaron las diferentes determinaciones de acuerdo a los procedimientos de operación estándar (POE) que han sido establecidos en la unidad de bioensayos y que a continuación se describen:

### 7.4.1 Ensayo hemolítico para la valoración de la actividad del sistema de complemento

#### 7.4.1.1 Determinación hemolítica para la actividad de la vía clásica del complemento

- Sensibilización y preparación de la suspensión de eritrocitos:
- Mezclar 2 ml de eritrocitos de carnero en Alsever con aproximadamente 8 ml de solución salina.
- Centrifugar a 2500 rpm (1250xg) por 5 minutos.
- Remover el sobrenadante, resuspender el pellet en 10 mL de solución salina y centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos. Repetir este paso una vez, después mantener el pellet de células empacadas sobre hielo.
- Suspender 200  $\mu$ l de células empacadas en 9.8 ml de VSB++
- Mezclar 100  $\mu$ l de esta suspensión con 4.9 ml de solución salina.
- Medir la densidad óptica (DO) a 410 nm. Una DO 410 nm. de 0.522 corresponde a una suspensión de eritrocitos de carnero de  $4 \times 10^8$  células/ml. Mantener la suspensión eritrocítica en hielo.
- Sensibilizar la suspensión eritrocítica con amboceptor, utilizando una mezcla de 1 ml de amboceptos (1:100) y 7 ml de VSB++, agregar 8 ml de la suspensión eritrocítica, incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugar; después lavar con VSB++ tres veces.
- Preparar una suspensión de eritrocitos a una concentración de  $1.15 \times 10^8$  células/ml y mantenerlas en hielo hasta su utilización.
- Agregar 100  $\mu$ l de muestra en los pozos respectivos y realizar diluciones seriadas, partiendo de una concentración de 500  $\mu$ g/ml.

#### 7.4.1.1.1 Preparación de controles para la mediación de actividad sérica:

- Agregar 50  $\mu$ l de VSB++ a los pozos H1-H6 (actividad del suero)

- Agregar 100 µl de VSB++ a los pozos H7-H9 (0% de hemólisis)
- Agregar 100 µl de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis)

#### 7.4.1.1.2 Preparación de la dilución del suero y preincubación:

- Agregar 50 µl de suero inactivo (63 µl de suero inactivo mezclado con 5 ml de VSB++) a los pozos H4-H6 y blancos de muestra.
- Mezclar 125 µl de la mezcla de suero humano (activo) con 10 mL de VSB++, y agregar de ésta 50 µl a los pozos control y muestra problema.
- Cubrir la placa y preincuba a 37°C por 60 minutos, cubrir la placa.
- Centrifugar la placa a 2500 rpm por dos minutos
- Después de la preincubación agregar 50 µl de la suspensión de ShEA a cada pozo.
- Incubar a 37°C por 60 minutos, cubrir la placa.
- Centrifugar la placa a 2500 rpm por dos minutos.

#### 7.4.1.1.3 Medición de hemólisis:

- Agregar 200 µl de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.
- Transferir 50 µl de los sobrenadantes a la placa correspondiente.
- Medir la DO a 405 nm en un espectrofotómetro de placa para ELISA.

#### 7.4.1.2 Determinación hemolítica para la actividad de la vía alterna del complemento

##### 7.4.1.2.1 Preparación de la suspensión de eritrocitos

- Lavar tres veces los eritrocitos de conejo con solución salina.
- Preparar con los eritrocitos una suspensión a una concentración de  $1.15 \times 10^8$  células/ml. Mantenerla en hielo hasta su utilización.
- Agregar 100 µl de muestra en los respectivos pozos y realizar diluciones seriadas iniciando con una concentración de 500 µg/ml

##### 7.4.1.2.2 Preparación de controles para la mediación de actividad sérica

- Agregar 50 µl de solución tampón (EGTA-VB) a los pozos H1-H6 (actividad del suero)
- Agregar 125 µl de EGTA-VB a las filas H7-H9 (0% de hemólisis)
- Agregar 125 µl de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis)

#### 7.4.1.2.3 Preparación de la dilución del suero y preincubación

- Agregar 25 µl de suero inactivo (mezclar 500 µl de suero inactivo con 500 µl de EGTA-VB) a los pozos H4-H6 y blancos de muestra.
- Mezclar 1 ml de suero activo EGTA-VB, y añadir 25 µl de ésta a los pozos control y muestra problema.
- Cubrir la placa y preincubar a 37°C por 30 minutos.
- Después de la preincubación agregar 25 µl de la suspensión de eritrocitos de conejo a cada pozo.
- Incubar a 37°C por 30 minutos, cubrir la placa.
- Centrifugar la placa a 2500 rpm por dos minutos.

#### 7.4.1.2.4 Medición de hemólisis

- Agregar 200 µl de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.
- Transferir 50 µl de los sobrenadantes a la placa correspondiente.
- Medir la DO a 405 nm en un espectrofotómetro de placa para ELISA.

### 7.4.2 Ensayo Linfoproliferativo

#### 7.4.2.1 Aislamiento y preparación de linfocitos

- Agregar sobre 5 mL de Histopaque un volumen de 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA, con una pipeta estéril.
- Centrifugar en frío a 2400 rpm por 20 minutos.
- Aspirar con cuidado la capa de linfocitos
- Luego proceder a transferir la capa de linfocitos a un tubo de centrifuga, agregando 10 mL de PBS y mezclar cuidadosamente.
- Centrifugar a 1400 rpm por 5 minutos
- Aspirar el sobrenadante y descartarlo.
- Resuspender las células en 2 ml de RPMI, y aforar hasta 15 mL.

- Centrifugar la suspensión a 1400 rpm por 5 minutos
- Aspirar el sobrenadante y descartarlo.
- Resuspender las células en 2 ml de RPMI-FBS, y aforar a 10 mL.

#### 7.4.2.2 Conteo celular

- Para calcular la concentración celular se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular con 90  $\mu\text{L}$  de la solución de Türk (factor de dilución 1:10)
- Sumergir la pipeta dentro de la mezcla, permitiendo la formación de una pequeña gota en la punta de la pipeta, colocarla cuidadosamente en la superficie periférica de la cubierta de la cámara de Neubauer.
- Contar microscópicamente 4 cuadrantes de la cámara y calcular la concentración celular de la siguiente manera:
  - Número total de células/ml = número total de células en 4 cuadrantes  $\times$  10 (factor de dilución)  $\times$   $1 \times 10^4$ .
  - Ajustar la concentración de linfocitos a  $5 \times 10^6$  células/ml con RPMI-FBS

#### 7.4.2.3 Reto linfoproliferativo

Debe realizarse en condiciones estériles

##### 7.4.2.3.1 Dilución de las muestras en una placa de microtitulación

- Agregar 50  $\mu\text{L}$  de RPMI-FBS a los pozos de las filas B a la H
- Para una dilución 1:2 se agregan 100  $\mu\text{L}$  de las muestras por triplicado en todos los pozos de la fila A. (Ej. A1, A2, A3 una muestra, A4, A5, A6 otra, etc.)
- Transferir 50  $\mu\text{L}$  de la fila A, a la B, mezclar y pasar 50  $\mu\text{L}$  de la B, a la fila C y así sucesivamente hasta la fila G, al final descartar 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de la fila G.
- Para lograr una dilución 1:3 se usan 75  $\mu\text{L}$  de muestra en la fila A y se transfieren 25  $\mu\text{L}$  a las siguientes filas
- Agregar 50  $\mu\text{L}$  de RPMI-FBS a las columnas A3 – G3, A6 – G6, A9 – G9, A12 – G12 y a la fila H7 – H12
- Agregar 50  $\mu\text{L}$  de solución de *Phaseolus vulgaris* (PHA) a todos los pozos.

- Pipetear 50 µL de la suspensión de linfocitos dentro de los pozos A1 a G1, A2 a G2, A4 a G4, A5 a G5, A7 a G7, A8 a G8, A10 a G10, A11 a G11 y H1 a H6 (control).
- Cubrir la placa e incubarla por 4 días en cámara húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 grados C.

#### 7.4.2.3.2 Cuantificación del crecimiento celular

- Después de 4 días de incubación, agregar 25 µL de solución de XTT a cada pozo
- Incubar a 37°C por 4 horas
- Agregar 50 µL de SDS e incubar a 60 min a 37°C.
- Medir la densidad óptica a 550 nm en un lector de ELISA.

## 7.5 CÁLCULOS

### Determinación de actividad sérica expresada como porcentaje de lisis.

$$\% \text{ Lisis} = \frac{\text{DO405 promedio}(H1,H2,H3) - \text{DO405 promedio}(H4,H5,H6) \times 100}{\text{DO405}(H10,H11,H12) - \text{DO405 promedio}(H7,H8,H9)}$$

### Actividad inhibitoria de la muestra vrs. Control

$$\% \text{ Lisis} = \frac{\text{DO405 promedio}(A1,A2) - \text{DO405 promedio}(A3) \times 100}{\text{DO405}(H1,H2,H3) - \text{DO405 promedio}(H4,H5,H6)}$$

### Cálculo de CI<sub>50</sub>

Se realiza la gráfica del porcentaje de inhibición vrs.log de concentración, con la recta de regresión lineal obtenida (al menos 4-5 valores significativos) y se extrapola el valor del 50% de inhibición para obtener la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>).

## 7.6 DISEÑO ESTADISTICO

### 7.6.1 Tipo de estudio:

Tipo de estudio cuasi-experimental.

### 7.6.2 Variables:

#### 7.6.2.1 Dependientes:

Extractos etanólicos y acuosos de *P.alliacea* y de *S. domingensis*, como plantas cultivadas nativas de Mesoamérica.

#### 7.6.2.2 Independientes:

Actividad inmunomoduladora *in vitro* de los extractos etanólicos y acuosos de las plantas estudiadas.

### 7.6.3 Validación de los Métodos:

#### 7.6.3.1 Ensayo linfoproliferativo:

La evaluación de la estimulación o inhibición de la linfoproliferación se efectúa con las unidades experimentales que son los linfocitos y la respuesta a medir, el recuento linfocitario. Realizando cinco replicas como número para obtener un nivel de  $\alpha = 0.05$  (según tabla de la distribución binomial).

Se determinó la Concentración Efectiva Mínima (CEM) a los extractos, realizando diluciones 1:3, partiendo de las concentraciones de 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.7  $\mu\text{g/ml}$ .

Grupo A: Lectina de PHA, como control positivo.

Grupo B: Blanco o control negativo.

Grupo C: Extracto etanólico de hoja de *P.alliacea*  
Grupo D: Extracto etanólico de raíz de *P.alliacea*  
Grupo E: Extracto etanólico de fruto de *S. domingensis*  
Grupo F: Extracto etanólico de hoja de *S. domingensis*  
Grupo G: Extracto etanólico de rizoma de *S. domingensis*  
Grupo H: Extracto acuoso de hoja de *P.alliacea*  
Grupo I: Extracto acuoso de raíz de *P.alliacea*  
Grupo J: Extracto acuoso de fruto de *S. domingensis*  
Grupo K: Extracto acuoso de hoja de *S. domingensis*  
Grupo L: Extracto acuoso de rizoma de *S. domingensis*

#### 7.6.3.2 Ensayo de Evaluación de la actividad del sistema de complemento

La respuesta a medir es la concentración de hemoglobina liberada por la lisis eritrocitaria. Se utilizó un número de replicas de cinco, para obtener un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$  (según tabla de la distribución binomial).

Se determinó la  $CI_{50}$  a los extractos que muestren efecto inmunodulador, utilizando diferentes diluciones partiendo de 1,000  $\mu\text{g/ml}$ . (1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243, 1:729).

## 7.7 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos fueron analizados a través de prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA), prueba múltiple de medias (Prueba de Tukey) y una comparación entre los diferentes órganos de las plantas realizadas; las respuestas a medir fueron:

### 7.7.1 Ensayo linfoproliferativo:

Los resultados se evaluaron de acuerdo a la siguiente escala:

Porcentaje de estimulación o inhibición < 25% =	Inalterado
Porcentaje de estimulación de 25-30% =	E +/-
Porcentaje de estimulación de 30 – 100% =	E +
Porcentaje de estimulación 100 – 200% =	E ++
Porcentaje de estimulación > 201% =	E +++
Porcentaje de inhibición de 25-30% =	I +/-
Porcentaje de inhibición de 31 – 50% =	I +
Porcentaje de inhibición 51 – 75% =	I ++
Porcentaje de inhibición de 76 -100% =	I +++

La respuesta a medir es positiva si el extracto estimuló o inhibió la proliferación de los linfocitos y fue negativa si la proliferación no se vio alterada por el extracto.

### 7.7.2 Determinación de relación dosis- efecto sobre el ensayo linfoproliferativo.

La determinación de la relación existente entre la dosis (concentración en µg/ml de cada extracto) y el efecto (% de inhibición media) de cada extracto etanólico y acuoso de los diferentes órganos de las plantas en estudio se obtuvo a través de la realización de dicha gráfica.

### 7.7.3 Ensayo hemolítico para la evaluación de la Actividad del Sistema de Complemento

La respuesta a medir es positiva si el extracto estimuló o inhibió la concentración de hemoglobina liberada comparada frente al resultado de la actividad sérica determinando dicho valor a través de la curva entre el porcentaje de inhibición vrs el logaritmo de la concentración, extrapolarlo el valor del 50% de inhibición. La respuesta fue negativa, si la concentración de hemoglobina liberada cuando al compararla con la actividad sérica y el control negativo se mantuvo inalterado.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Selección de las plantas y obtención de extractos etanólicos y acuosos

Las plantas evaluadas en este estudio poseen atribuciones medicinales de uso popular como antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas, antiséptica y desinflamante, entre otras. En la etapa inicial se realizó la recolección del material cultivado, procediendo a su percolación y rotaevaporación con etanol al 70 % para la obtención de los extractos etanólicos. Se calculó el porcentaje de rendimiento en base a la droga seca percolada obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 1):

**Tabla 1.** Porcentaje de rendimiento de extractos etanólicos al 70% de *P. alliacea* y *S. domingensis*

Planta	Extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)*
<i>P. alliacea</i> (hoja)	76.42	30.57
<i>P. alliacea</i> (raíz)	91.29	36.52
<i>S. domingensis</i> (fruto)	154.9	61.96
<i>S. domingensis</i> (hoja)	119.36	47.74
<i>S. domingensis</i> (rizoma)	97.8	39.12

\*Fuente: Datos experimentales. Porcentaje calculado en base a droga seca.

En la Tabla 2 se observan los resultados de la obtención de extractos acuosos de las diferentes partes de *P. alliacea* y *S. domingensis* realizados a través de la infusión por sonicación y liofilización de los mismos, calculando su porcentaje de rendimiento.

**Tabla 2.** Porcentaje de rendimiento de extractos acuosos de *P. alliacea* y *S. domingensis*

Planta	Extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)*
<i>P. alliacea</i> (hoja)	0.90	4.5
<i>P. alliacea</i> (raíz)	0.97	4.85
<i>S. domingensis</i> (fruto)	3.83	19.15
<i>S. domingensis</i> (hoja)	1.14	3.80
<i>S. domingensis</i> (rizoma)	5.5	27.5

\*Fuente: Datos experimentales.

## 8.2 Evaluación de la actividad linfoproliferativa

Para determinar la presencia o ausencia de la actividad inmunomoduladora de extractos etanólicos y acuosos de las plantas en estudio, se realizaron dos bioensayos, para medir la actividad linfoproliferativa y actividad del sistema de complemento en sus dos vías (vía clásica y vía alterna).

En el primer ensayo se determinó la actividad linfoproliferativa haciendo uso del PHA como control positivo y a los extractos que mostraron algún tipo de actividad se les determinó la CEM utilizando diferentes concentraciones de los extractos, mostrando estos resultados en las Tablas 3 y 4.

Todos los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente a través del análisis de varianza (ANOVA) para determinar si la actividad inmunomoduladora sobre los linfocitos fue significativa, según los valores de F y p (Tabla en Anexo 1).

**Tabla 3.** Determinación de actividad inmunomoduladora sobre la linfoproliferación y determinación de la Concentración Efectiva Mínima (CEM) en extractos etanólicos.

LINFOPROLIFERACIÓN POR EXTRACTOS ETANÓLICOS										
	<i>P. alliacea</i> (hoja)		<i>P. alliacea</i> (raíz)		<i>S. domingensis</i> (fruto)		<i>S. domingensis</i> (hoja)		<i>S. domingensis</i> (rizoma)	
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Inhibición Media $\pm$ DS	*Actividad	% Inhibición Media $\pm$ DS	*Actividad	% Inhibición Media $\pm$ DS	*Actividad	% Inhibición Media $\pm$ DS	*Actividad	% Inhibición Media $\pm$ DS	*Actividad
1000	<b>202.34 <math>\pm</math> 3</b>	<sup>c</sup> I+++	51.35 $\pm$ 10	-	<b>73.65 <math>\pm</math> 11</b>	<sup>a</sup> I+	<b>95.07 <math>\pm</math> 22</b>	<sup>a</sup> I+	<b>286.36 <math>\pm</math> 29</b>	<sup>c</sup> I+++
500	171.54 $\pm$ 16	-	46.79 $\pm$ 6	-	64.94 $\pm$ 8	-	68.95 $\pm$ 21	-	<b>174.32 <math>\pm</math> 16</b>	<sup>b</sup> I++
250	147.17 $\pm$ 18	-	33.03 $\pm$ 13	-	49.94 $\pm$ 5	-	60.28 $\pm$ 11	-	<b>124.05 <math>\pm</math> 11</b>	<sup>b</sup> I++
125	155.05 $\pm$ 14	-	34.80 $\pm$ 12	-	46.29 $\pm$ 16	-	60.45 $\pm$ 10	-	90.72 $\pm$ 10	-
62.5	141.96 $\pm$ 20	-	34.95 $\pm$ 19	-	52.99 $\pm$ 11	-	52.41 $\pm$ 2	-	76.62 $\pm$ 7	-
31.2	139.47 $\pm$ 20	-	36.69 $\pm$ 6	-	45.67 $\pm$ 4	-	71.0 $\pm$ 16	-	79.55 $\pm$ 8	-
15.7	157.23 $\pm$ 19	-	35.76 $\pm$ 12	-	52.58 $\pm$ 12	-	58.07 $\pm$ 3	-	80.76 $\pm$ 6	-

\*DS: Desviación estándar; Actividad de tipo Inhibitoria según escala y % de inhibición.

Fuente: Datos experimentales.

<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición de 31 – 50% = I +

<sup>b</sup> Porcentaje de inhibición de 51 – 75% = I ++

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

**Tabla 4.** Determinación de actividad inmunomoduladora sobre la linfoproliferación y determinación de la Concentración Efectiva Mínima (CEM) en extractos acuosos.

LINFOPROLIFERACIÓN POR EXTRACTOS ACUOSOS											
	<i>P. alliacea</i> (hoja)		<i>P. alliacea</i> (raíz)		<i>S. domingensis</i> (fruto)		<i>S. domingensis</i> (hoja)		<i>S. domingensis</i> (rizoma)		
Concentración (µg/mL)	%Inhibición		% Inhibición		% Inhibición		% Inhibición		% Inhibición		
	Media ± DS	Actividad	Media ± DS	Actividad	Media ± DS	Actividad	Media ± DS	Actividad	Media ± DS	Actividad	
1000	184.85 ± 5	<sup>b</sup> I++	84.29 ± 4	<sup>a</sup> I+	81.57 ± 28	-	286.36 ± 29	<sup>c</sup> I+++	224.73 ± 12	<sup>c</sup> I+++	
500	177.01 ± 8	<sup>b</sup> I++	71.02 ± 17	<sup>a</sup> I+	64.91 ± 5	-	174.33 ± 16	<sup>c</sup> I+++	146.16 ± 23	<sup>b</sup> I++	
250	161.21 ± 5	-	63.92 ± 19	<sup>a</sup> I+	73.36 ± 19	-	124.0 ± 11	<sup>b</sup> I++	86.39 ± 14	-	
125	149.17 ± 4	-	58.53 ± 3	-	72.72 ± 11	-	90.72 ± 10	-	73.62 ± 9	-	
62.5	146.57 ± 7	-	44.50 ± 6	-	78.99 ± 9	-	79.55 ± 8	-	62.94 ± 17	-	
31.2	143.55 ± 4	-	44.72 ± 14	-	72.80 ± 6	-	80.76 ± 6	-	76.87 ± 8	-	
15.7	148.75 ± 2	-	30.03 ± 6	-	65.08 ± 16	-	76.62 ± 7	-	76.64 ± 7	-	

\*DS: Desviación estándar; Actividad de tipo Inhibitoria según escala y % de inhibición.

Fuente: Datos experimentales.

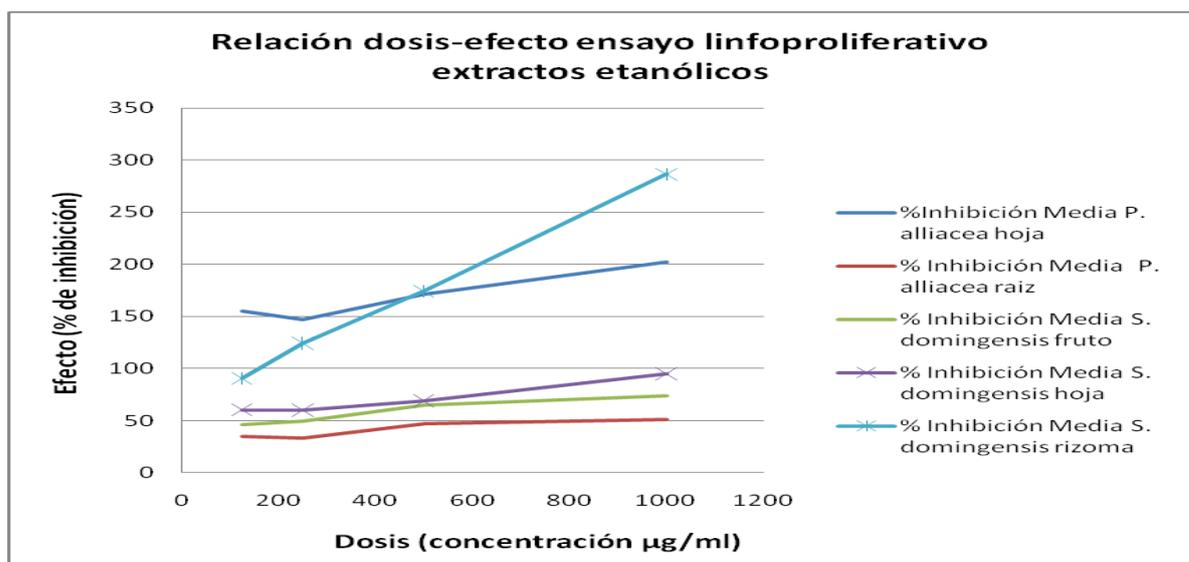
<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición de 31 – 50% = I +

<sup>b</sup> Porcentaje de inhibición de 51 – 75% = I ++

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

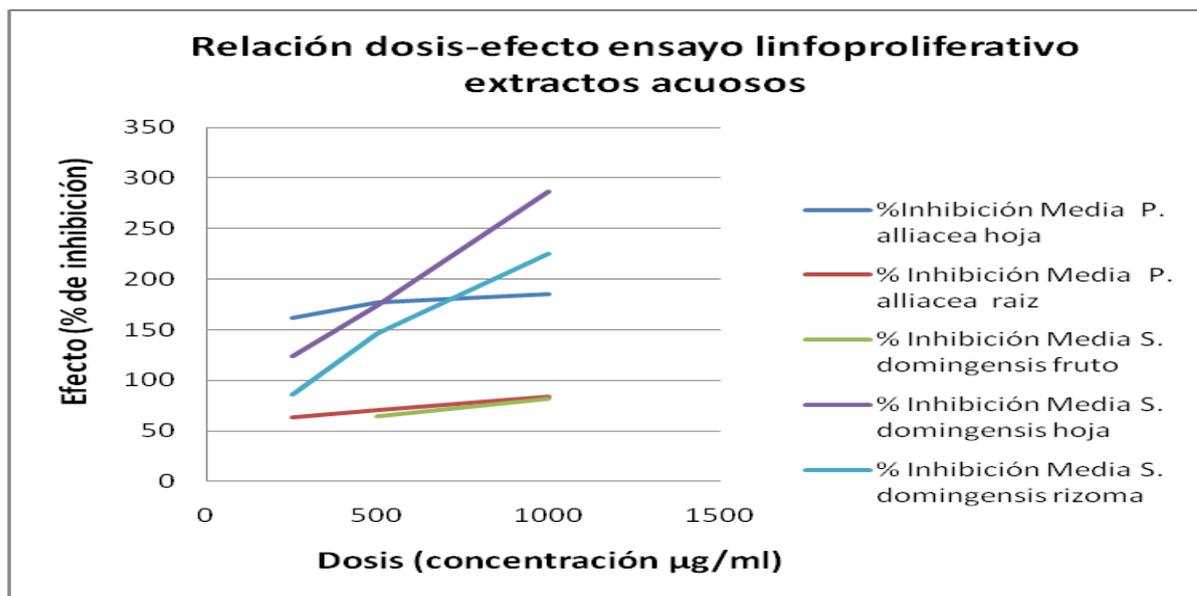
En las Gráficas 1 y 2, se observa la relación dosis-efecto que existe entre los diferentes extractos de cada planta, evidenciándose una relación directa entre la concentración del extracto y su porcentaje de inhibición.

**Gráfica 1.** Relación dosis-efecto sobre el ensayo linfoproliferativo por extractos etanólicos



\*Fuente: Datos experimentales.

**Gráfica 2.** Relación dosis-efecto sobre el ensayo linfoproliferativo por extractos acuosos



\*Fuente: Datos experimentales.

### 8.3 Evaluación de la actividad sobre el sistema de complemento vía clásica

Los extractos etanólicos y acuosos de hoja y raíz de *P. alliacea*, mostraron actividad inhibitoria al igual que los extractos etanólicos y acuosos de rizoma de *S. domingensis* en la vía clásica del sistema de complemento. El extracto de hoja de *S. domingensis* fue activo solamente en su fase etanólica sobre la vía clásica. A cada extracto se le determinó el  $CI_{50}$  que es la cantidad de extracto necesaria para producir el 50% de hemólisis partiendo de una concentración inicial de 1,000 µg/ml realizando diluciones hasta una concentración de 1.37 µg/ml (Tabla 5 y Gráficas en Anexo 13.5).

**Tabla 5.** Determinación del  $CI_{50}$  para el sistema de complemento vía clásica

Planta	VÍA CLÁSICA			
	Extracto etanólico $CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$	Tipo de actividad	Extracto acuoso $CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$	Tipo de actividad
<i>P. alliacea</i> (hoja)	6.92	Inhibidora	5.19	Inhibidora
<i>P. alliacea</i> (raíz)	5.32	Inhibidora	7.91	Inhibidora
<i>S. domingensis</i> (fruto)	133.34	No activa	174.43	No activa
<i>S. domingensis</i> (hoja)	13.48	Inhibidora	48.66	No activa
<i>S. domingensis</i> (rizoma)	2.82	Inhibidora	5.11	Inhibidora

\*Fuente: Datos experimentales.

#### 8.4 Evaluación de la actividad sobre el sistema de complemento vía alterna

Los resultados obtenidos en la vía alterna muestran que tanto los extractos etanólicos como los acuosos de hoja y raíz de *P. alliacea* y la hoja y rizoma de *S. domingensis* poseen actividad de tipo inhibitoria (Tabla 6 y Gráficas en Anexo 13.4).

Los extractos etanólicos y acuosos del fruto de *S. domingensis* no muestra actividad de ningún tipo en ninguna de las vías del sistema del complemento (Tablas 5 y 6 y Gráficas en Anexo 13.4 y 13.5).

**Tabla 6.** Determinación del  $CI_{50}$  para el sistema de complemento vía alterna.

Planta	VÍA ALTERNA			
	Extracto etanólico $CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$	Tipo de actividad	Extracto acuoso $CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$	Tipo de actividad
<i>P. alliacea</i> (hoja)	3.38	Inhibidora	5.08	Inhibidora
<i>P. alliacea</i> (raíz)	7.96	Inhibidora	1.13	Inhibidora
<i>S. domingensis</i> (fruto)	193.85	No activa	44.06	No activa
<i>S. domingensis</i> (hoja)	3.88	Inhibidora	4.05	Inhibidora
<i>S. domingensis</i> (rizoma)	1.53	Inhibidora	4.62	Inhibidora

\* Fuente: Datos experimentales.

## 8.5 Comparación entre estudios utilizando material vegetal silvestre con material vegetal cultivado.

Se analizaron las diferencias encontradas entre el material vegetal silvestre y material vegetal cultivado. Los resultados de material silvestre fueron reportados para *S. domingensis* por Meza (69), en donde sólo se llevo a cabo el ensayo linfoproliferativo utilizando el extracto etanólico de rizoma el cual no mostró actividad, se encontró diferencia con los resultados obtenidos en este estudio, ya que se encontró actividad de tipo inhibitorio. Los resultados de material silvestre reportados por Osorio (39), utilizando extractos etanólicos de hoja y raíz de *P. alliacea* en donde solo se llevo el análisis de la actividad sobre el sistema de complemento, mostraron actividad de tipo inhibitorio tanto en material silvestre como en material cultivado para la vía clásica; sin embargo para la vía alterna el material silvestre mostró actividad estimulante y en material cultivado mostró actividad inhibitoria (tabla 7), discrepando con los resultados obtenidos en este trabajo.

**Tabla 7.** Comparación de resultados obtenidos utilizando material vegetal silvestre vs. Material vegetal cultivado.

			Material Silvestre			Material Cultivado		
Planta	Órgano	Tipo de extracto	Actividad			Actividad		
			<sup>1</sup> L	<sup>2</sup> V.C (CI <sub>50</sub> µg/ml)	<sup>3</sup> V.AI (CI <sub>50</sub> µg/ml)	<sup>1</sup> L	<sup>2</sup> V.C (CI <sub>50</sub> µg/ml)	<sup>3</sup> V.AI (CI <sub>50</sub> µg/ml)
<i>S. domingensis</i>	Rizoma	Etanólico	<sup>a</sup> No activa	---	---	Actividad Inhibitoria +++	---	---
<i>P. alliacea</i>	Hoja	Etanólico	---	<sup>b</sup> 5.0	<sup>b</sup> 7.0	---	6.92	3.38
<i>P. alliacea</i>	Raíz	Etanólico	---	<sup>b</sup> 14.0	<sup>b</sup> 6.0	---	5.32	7.96

<sup>1</sup>L = Ensayo linfoproliferativo

<sup>2</sup>V.C = Vía Clásica del complemento

<sup>3</sup>V.AI = Vía Alterna del complemento

<sup>a</sup>Resultado según Meza, 2001.

<sup>b</sup>Resultado según Osorio, 2003.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio fue evaluada la actividad inmunomoduladora *in vitro* de extractos etanólicos y acuosos de las plantas *P. alliacea* y *S. domingensis* cultivadas a través de la linfoproliferación y de la actividad del sistema de complemento; ya que al material de dichas plantas en su estado silvestre se le ha demostrado uso y actividad en la medicina popular.

Los extractos etanólicos se obtuvieron empleando etanol al 70% como disolvente, porque se ha demostrado que es posible recuperar hasta un 80% de los componentes activos de *P. alliacea* y de *S. domingensis*, algunos de los cuales son solubles tanto en etanol como en agua y otros componentes que son únicamente solubles en etanol. Los extractos acuosos se obtuvieron a través de infusión y sonificación para su posterior liofilización, extrayendo compuestos como los taninos los cuales son solubles solo en agua.

El primer ensayo fue el ensayo linfoproliferativo cuya metodología consistió en un método colorimétrico en donde se empleo una sal de tetrazolio (XTT) para la determinación de la linfoproliferación, el cual ha sido utilizada en estudios previos. Dicho compuesto disminuye el sesgo de incluir el debris celular, incluyendo únicamente a las células vivas, ya que es reducido a un producto coloreado y soluble como resultado de la actividad enzimática mitocondrial presente en las células vivas por lo que provee de especificidad a la metodología. Además se utilizó la PHA que es una lectina, la cual activa la linfoproliferación de las células T específicamente (66).

Los extractos estudiados que presentaron alguna actividad linfocítica fueron el extracto etanólico de rizoma de *S. domingensis*, extractos acuosos de raíz y hoja de *P. alliacea* y rizoma de *S. domingensis*, determinándose posteriormente su CEM siendo de: 250 µg/ml para el extracto etanólico de rizoma de *S. domingensis*, 500 µg/ml para el extracto acuoso de hoja, 250 µg/ml para el extracto acuoso de raíz y hoja de *P. alliacea* y 500 µg/ml para el extracto acuoso de rizoma de *S. domingensis*.

Los extractos etanólicos de hoja de *P. alliacea*, fruto y hoja de *S. domingensis* mostraron actividad únicamente en la concentración inicial de 1,000 µg/ml y los extractos sin actividad fueron extracto etanólico de raíz de *P. alliacea* y extracto acuoso del fruto de *S. domingensis* (Tablas 3 y 4).

La relación dosis-efecto de los extractos etanólicos y acuoso sobre el ensayo de linfoproliferación mostró una relación directamente proporcional entre el efecto (% de inhibición) y la dosis (concentración del extracto), ya que se muestra que a mayor concentración del extracto hay un mayor porcentaje de inhibición, mientras que la disminución de la concentración disminuye su actividad inhibitoria.

Los extractos acuoso de hoja y raíz de *P. alliacea* y hoja y rizoma de *S. domingensis* fueron los que presentaron mejor actividad, debido a que en el extracto acuoso se logra extraer compuestos como los taninos presentes en hojas y tallos jóvenes de *P. alliacea* y de *S. domingensis* a los cuales se les atribuyen actividades inmunomoduladoras (67).

Dichas plantas a su vez contienen en común minerales entre sus componentes activos tales como zinc, cobre y hierro los cuales actúan sobre el sistema inmunológico ayudando a mantenerlo en óptimas condiciones.

El segundo ensayo fue la valoración del sistema de complemento, utilizando para ello el ensayo descrito por Klerx y colaboradores, basado en la hemólisis de los eritrocitos por el Complejo de Ataque a la Membrana (CAM) generado al activarse el sistema de complemento. En este ensayo los eritrocitos actúan como activadores y células blanco, activándose y produciendo la lisis de los eritrocitos, liberando así la hemoglobina que es medida para estimar la actividad (10).

Los resultados obtenidos en el ensayo del sistema de complemento mostraron que tanto para la vía clásica como para la vía alterna, la mayoría de los extractos tanto etanólicos como acuoso de hoja y raíz de *P. alliacea*, hoja y rizoma de *S. domingensis* presentaron un efecto inhibitorio de ambas vías, determinado por su  $CI_{50}$  (Tabla 5 y 6), por el contrario los extractos que no mostraron ninguna actividad fueron: extractos etanólicos y

acuoso de fruto en la vía clásica y alterna y extracto acuoso de hoja de *S. domingensis* en vía clásica.

Esto se estableció con la determinación del  $CI_{50}$  considerando un límite de 15  $\mu\text{g/ml}$  como punto significativo de corte para establecer la presencia o ausencia de la actividad sobre las vías clásicas y alternas del complemento; este punto es especialmente útil en la vía alterna dada su alta susceptibilidad de activación frente a bajas concentraciones de sustancias contaminantes produciendo resultados inespecíficos, por lo tanto se consideró para ambas vías un resultado activo (positivo) a una concentración menor de 15  $\mu\text{g/ml}$  e inactivo (negativo) a una concentración mayor a 16  $\mu\text{g/ml}$ . Se tomó este punto de corte ya que se consideró menores a 15  $\mu\text{g/ml}$  representan la actividad propia de la planta; por el contrario una concentración mayor a 16  $\mu\text{g/ml}$  no es representativa, porque podría incluir sustancias interferentes tales como bacterias, hongos, polisacáridos, entre otros al momento de ser evaluados.

Como se sabe el complemento es el principal mecanismo efector de la inmunidad humoral, cuando este se activa puede causar inflamación. Cuando el complemento interactúa con extractos de plantas que tienen propiedades antiinflamatorias se tiene como resultado un efecto inhibitor, respaldando la actividad que se mostró en este estudio (68).

Los extractos etanólicos y acuoso de fruto de *S. domingensis* mostraron un valor de  $CI_{50}$  por arriba del valor de importancia farmacológica.

En base a la tabla 7 se puede inferir que respecto al ensayo de linfoproliferación hay una diferencia significativa entre los resultados obtenidos por Meza en 2001, utilizando rizoma de *S. domingensis* en estado silvestre con lo obtenido en este estudio, ya que el material vegetal utilizado fue cultivado observándose que mostro una actividad inhibitoria alta sobre los linfocitos (69); en cuanto a lo observado sobre el sistema de complemento en la vía clásica no hay diferencia entre los resultados obtenidos por Osorio en 2003 con material silvestre de *P. alliacea* y lo obtenido en este estudio utilizando material cultivado ya que ambas muestran actividad inhibitoria con un valor de  $CI_{50}$  menor a 15  $\mu\text{g/ml}$ , por el contrario para la vía alterna la actividad reportada por Osorio fue de tipo estimulante;

mientras que este estudio se observó una actividad de tipo inhibitoria (39), esto pudo deberse a que el estudio realizado por Osorio fue una adaptación del microensayo descrito por Klerx y colaboradores, aumentando el riesgo de incluir sustancias interferentes que pueden activar la vía laterna.

La importancia de realizar esta comparación radica en determinar si existe una diferencia significativa de la actividad presentada por los extractos provenientes de material silvestre en comparación con extractos de material cultivado, por lo que se puede afirmar que la actividad presente o no en un extracto no se ve relacionada directamente con el hecho de ser cultivado o no, si no bien de la forma en que se obtuvo el extracto como el tipo de disolvente utilizado ya que de este dependerá la clase y la cantidad de compuestos activos presentes de material vegetal.

El mayor beneficio de utilizar material vegetal cultivado es el poder obtener mayor volumen para aprovechamiento en forma sostenible.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 Los extractos etanólicos de rizoma de *S. domingensis* y extractos acuosos de hoja y raíz de *P. alliacea* y hoja y rizoma de *S. domingensis* presentaron actividad de tipo inhibitoria sobre la linfoproliferación.
- 10.2 Los extractos tanto etanólicos y acuosos de hoja y raíz de *P. alliacea*, hoja y rizoma de *S. domingensis* presentaron un efecto inhibitorio en la vía clásica y la vía alterna del sistema de complemento.
- 10.3 Los extractos etanólicos y acuosos de fruto y extracto acuoso de hoja de *S. domingensis* no mostraron actividad importante.
- 10.4 Se comprobó la hipótesis propuesta de que al menos uno de los extractos de los diferentes órganos de *P. alliacea* y *S. domingensis* posee actividad inmunomoduladora *in vitro*, en este caso de tipo inhibitoria.
- 10.5 Los extractos procedentes de material cultivado de *P. alliacea* y *S. domingensis* representan una gran ventaja en su obtención específicamente en su fuente y en el uso de sus principios activos.
- 10.6 Los extractos de *P. alliacea* y *S. domingensis* procedentes de órganos cultivados que presentaron resultados positivos con efecto inmunoinhibidor son promisorios para su uso futuro como fuente de fármacos con fines terapéuticos.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar estudios *in vivo* que 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 esto es indispensable para el desarrollo de fármacos.
- 11.2 Determinar los componentes activos de los extractos que presentaron actividad inmunomoduladora, así como su mecanismo de acción.
- 11.3 Evaluar la actividad *in vitro* en extractos de diferentes polaridades de *P. alliacea* y *S. domingensis*.
- 11.4 Realizar investigaciones para determinar otras aplicaciones medicinales de las plantas evaluadas en este estudio, puesto que la mayoría de plantas poseen más de un solo uso terapéutico.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Margani R. Fundamentos de Inmunología e Inmunoquímica. Argentina: Editorial Medica Panamericana, 1996. 970p.
2. Stites DP, Terr A I. Inmunología Básica y Clínica. 7ed. Carsolio M, tratad. México: Manual Moderno, 1993. 946 p.
3. Parslow G, Stites P, Imboden B. Inmunología Básica y Clínica. México: Editorial Manual Moderno, 2002. 917p.
4. Rojas, William. Inmunologia (12ª Ed). Colombia, Medellín. Corporación para investigaciones biológicas 2001. 720p.
5. Guermonprez P, *et. al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:621-67.
6. Sproul T, *et. al* Role for MHC class II antigen processing in B cell development. *Int Rev Immunol.* 2000; 19:139-55.
7. Holtmeier W, Kabelitz D. T cells link innate and adaptive immune responses *Chem Immunol Allergy.* 2005; 86:151-183.
8. Martínez Manrique CE. Modulación de la respuesta inmune. Tendencias vigentes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2005; 9:3-5.
9. Y. A. Hata U., “Estandarización de la técnica de inhibición del sistema del complemento y su aplicación al screening de extractos vegetales con actividad inmunomoduladora”, Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia, 2000. 87p.
10. Klerx, J.P, *et. al.* Microscopy for colorimetric stimulation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *J Immunol Methods.* 1983; 63:215-220.
11. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55–63.
12. Wimer BM. Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer Biother Radiopharm.* 1996; 11:57-75.
13. Hernández P, Martín O, Rodríguez de Pablos Y, Ganen FA. Estudio de la fitohemaglutinina proveniente del frijol colorado (*Phaseolus vulgaris*). *Rev Cubana Hematol Immunol Hemoter.* 1999; 15:210-4.
14. Sumner JB, Howell SF. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A. *J Bacteriol.* 1936;32:227-37
15. Frane H. Lectins definition and classification. *Acta Histochem.* 1982;71:19-21.

16. Bafna A, Mishra S. Immunomodulatory activity of methanol extract of flower-heads of *Sphaeranthus indicus* Linn. *Ars Pharmaceutica*. 2004;45: 281-91.
17. Israelsen LD. Phytomedicines: the greening of modern medicine. *J Altern Comp Med*. 1995;1:245-48.
18. Wolf H. Can orally applied immunomodulators improve local defense? In: Masahi KN, ed. *Immunotherapy of Infections*. New York: Marcel Dekker. 1994; 44:351-55.
19. Parnham MJ. Benefit-risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation *Phytomed*. 1996; 3:95-102.
20. Schulz V, Hansel R, Tyler VE. Agents that increase resistance to diseases. In: *Rational Phytotherapy*. New York:Springer-Verlag; 1998; 1:269-85.
21. Chan A., E. Yip, L. Yung, H. Pang, S. Luk, S. Pang y Y. Wong. Immuno-regulatory effects of CKBM on the activities of mitogen-activated protein kinases and the release of cytokines in THP-1 monocytic cells. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28:1645-50.
22. Queiroz M., M. Quadros y L. Santos. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2000; 22:501-18.
23. Larsen M., C. Moser, N. Hoiby, Z. Song y A. Kharazmi. Ginseng modulates the immune response by induction of interleukin-12 production. *APMIS*. 2004; 112:369-73.
24. Ho C., C. Lau, C. Kim, K. Leung, K. Fung, T. Tse, Chan H. y M. Chow. Differential effect of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4:1549-57.
25. Wilasrusmee O, Kitturs S, Shah G. Immunostimulatory effect of *Silybum marianum* (milk thistle) extract. *Med Sci Monit*. 2002; 8:439-43.
26. Amirghofran Z, Azadbacht H, Karimi M. evaluation of the immunomodulatory effects, of five herbal plantas. *J Ethnopharmacol*. 2000; 72:167-72.
27. Coeugnet EG, Elek E. Immunomodulation with *Viscum album* and *Echinacea purpurea* extracts. *Onkologie*. 1987; 10:27-33.
28. Bauer R. Echinacea drugs—effects and active ingredients. *Zeitschrift fur Arztliche Fortbildung (Jena)*. 1996; 90:111-15.
29. Anderson R, van Antwerpen VL. Vitamins in the maintenance of optimum immune functions and in the prevention of phagocyte-mediated tissue damage and carcinogenesis. *Bibliotheca Nutr Diet*. 1995; 52:66-74.

30. Krinsky N. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53:2385-65.
31. Lee YS, Chung IS, Lee IR, Kim KH, Hong WS, Yun YS. Activation multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res.* 1997; 17:323-31.
32. Akagawa G, Abe S, Tansho S, Uchida K, Yamaguchi H. Protection of C3H/HEJ mice from development of *Candida albicans* infection by oral administration of Juzen-taiho-to and its component, Ginseng radix: possible roles of macrophages in the host defense mechanisms. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1996; 18:73-89.
33. ARA RA. Cien plantas medicinales escogidas. Ed. EDAF S.A. Madrid – España, 1997. 411p.
34. Reyes E *et al.* Systemic immunomodulatory effects of *Polypodium leucotomos* as an adjuvant to PUVA therapy in generalized vitiligo: A pilot study. *J Dermatol Sci.* 2006; 41:213-16.
35. Tuominen M, Bohlin L, Rolfsen W. Effects of calaguala and an active principle, adenosine on platelet activating factor. *Planta Med.* 1992; 58:306-10.
36. Zhou H, Deng Y, Xie Q. The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. *Jethpharm* 2006; 105:301-05.
37. Lopez, M. Plantas Medicinales con Actividad Inmunomoduladora. OFFARM. 2008; 27:11-15.
38. Alonso JR. Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas. Argentina; Ediciones SRL. 1998. 967p.
39. Osorio A. Tamizaje de la actividad inmunomoduladora del sistema de complemento por extractos de cinco plantas medicinales usadas en el tratamiento de infecciones protozoarias intracelulares. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. 60p.
40. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. 402p.
41. Marini S *et al.* Effects of *Petiveria alliacea* on cytokine production and natural killer cell activity. *Pharmacol Res.* 1993; 27:107-08.
42. Rossi V *et al.* Effects of *Petiveria alliacea* on cell immunity. *Pharmacol Res.* 1993; 27:111-12

43. Williams LAD, The TI, Gardner MT, *et al.* Immunomodulatory activities of *Petiveria alliacea* L. *Phytother Res.* 1997; 11:251-53
44. quadros MR, Souza Brito AR, Queiroz ML. *Petiveria alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection-effects on bone marrow progenitor cells. *Inmunopharmacol inmunotoxicol.* 1999; 21:109-24
45. Pineda L. Actividad de extractos de raíz, rizoma, tallo de diferentes especies de *Smilax*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1998. 47p.
46. Gutierrez M.A. *et al.* El mercado potencial de ocho plantas medicinales latinoamericanas\* *Lippia alba*, *Lippia graveolens*, *Pasiflora edulis*, *Petiveria alliacea*, *Phlebodium aureum*, *Quassia amara*, *Arrabidaea chica* y *Smilax domingensis*. Palmira Colombia, 2004. 40 p.
47. Cruz S. M. *et al.* Comprobación farmacológica y evaluación fitoquímica de extractos de dos especies vegetales cultivadas usadas en Guatemala como antiinflamatorios, analgésicos e inmunomoduladores. *Revista Universitaria* 31 de mayo de 2008. 98p.
48. Germosén-Robineau L. *Farmacopea caribeña.* GRAMIL.. Martinico: Emile Desormeaux, 1997:247-50.
49. Standley PC, Steyermark JA |*Flora of Guatemala.* Fieldiana: Botany. 1946; 24:196
50. Benevides PJ. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochem.* 2001; 57:743-7.
51. De Souza J. Dibenzyl (trisulphide and trans-N-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria alliacea* L. *Phytochem.* 1990; 29:3653-5.
52. Ocampo R.A, *et al.* *Manual de Agrotecnología de las Plantas Medicinales Nativas.* 1 ed. San José, Costa Rica: Ediciones Sanabria, 2007. 144p.
53. Antoun M, Gerena L, Milhous WK. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. *Int J Pharm.* 1993; 31:255-8.
54. Weniger B. Popular medicine of the central plateau of Haiti. *J Ethnopharmacol.* 1986; 17:13- 30.
55. Arenas P. Medicine and magic among the Minka Indians of the Paraguayan Chaco. *J Ethnopharmacol.* 1987; 21:279-95.
56. Cáceres A. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment dermatomucosal diseases. *J Ethnopharmacol.* 1987; 20:223-37.

57. Robineau L Hacia una Farmacopea Caribeña. Santo Domingo, Enda-Caribe y Universidad Nacional Autónoma de Honduras. 1989. 278-28p.
58. Berdy, J. CRC Handbook of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J Ethnopharmacol. 1982; 20:223- 37.
59. Von Szczepanski, C.; Zgorzelak, P.; Hoyer, G. Isolation, structure determination and synthesis of an antimicrobial substance from *Petiveria alliacea*. *Arzneim. Forsch.* 1972; 22: 143-148.
60. Furones J.A *et al.* Ausencia de la acción analgésica de la *Petiveria alleacea* (Apacín) en ratones. *Rev Cubana Plant Med.* 1996; 1:16-18.
61. Monache F. 6-C-formyl and 6-C-hidroxymethylflavonones from *Petiveria alliacea* (leaves). *Phytochm.* 1992; 31:2481-2.
62. Anesini C, Pérez C. Screening of plants used in Argentine Folkmedicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 1993; 39:119- 28.
63. Elisabetsky E, Castilhos ZC. Plants used as analgesics by Amazonian Caboclos as a basis for selecting plants for investigation. *Int J Crude Drug Res.* 1990; 28: 309-20.
64. Del Valle L, *et al.* Efecto de un extracto de *Petiveria alliacea* L. sobre la proliferación de linfocitos humanos. *Rev Cubana hematol Inmunol Hemoter.* 1993; 9:134-135.
65. Germano D., Tropical anto-inflammatory activity and toxicity of *Petiveria alliacea*, *Fitoterapia.* 1993; 64: 459-62.
66. Scudeiro DA, *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 Res.* 1988;48:4827-4833.
67. Monter, M; Willkomirsky, T; Valenzuela L. *Plantas Medicinales.* Universidad de Concepción, Chile.1992. 250p.
68. Maves KK, Weiler J. Properdin: approaching four decades of research. *Immunol Res* 1993; 12:233-243.
69. Meza N. Efecto de cinco extractos de plantas nativas usadas como adaptatógenos en la actividad linfocitaria *in vitro*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. p 38.

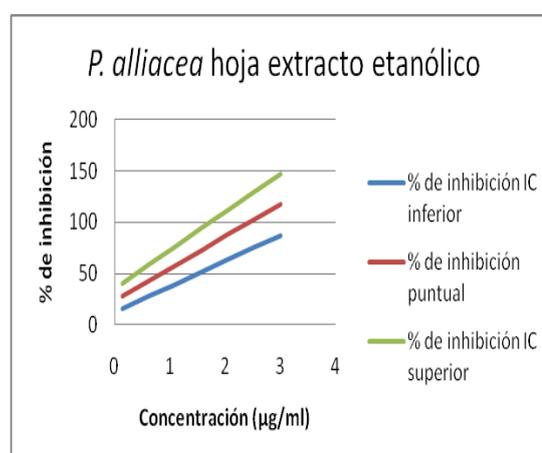
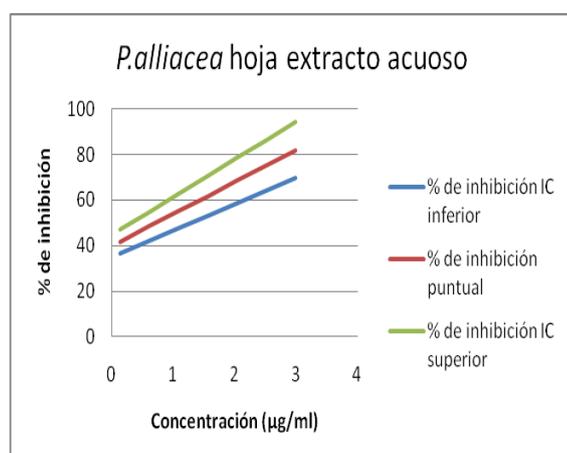
## 13. ANEXOS

### 13.1 VALORES DE F Y P OBTENIDOS A TRÁVES DE ANÁLISIS DE VARIANZA EN EL ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN

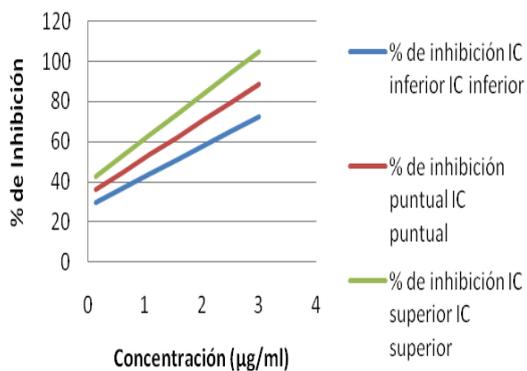
Planta	Extractos Etanólicos		Extractos Acuoso	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
<i>P. alliacea</i> (hoja)	5.02	0.0025	28.91	4.13 e <sup>-09</sup>
<i>P. alliacea</i> (raíz)	1.04	0.43	7.53	0.00021
<i>S. domingensis</i> (fruto)	3.00	0.028	0.51	0.80
<i>S. domingensis</i> (hoja)	2.98	0.029	83.46	1.49 e <sup>-13</sup>
<i>S. domingensis</i> (rizoma)	83.46	1.49 e <sup>-13</sup>	53.35	1.24 e <sup>-11</sup>

\*Fuente: Datos experimentales.

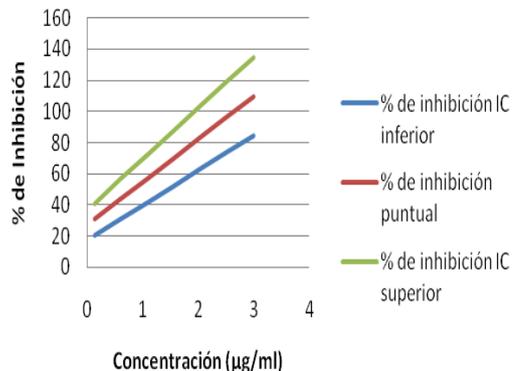
### 13.2 GRÁFICAS DE INTERVALOS DE CONFIANZA VÍA CLÁSICA DEL COMPLEMENTO



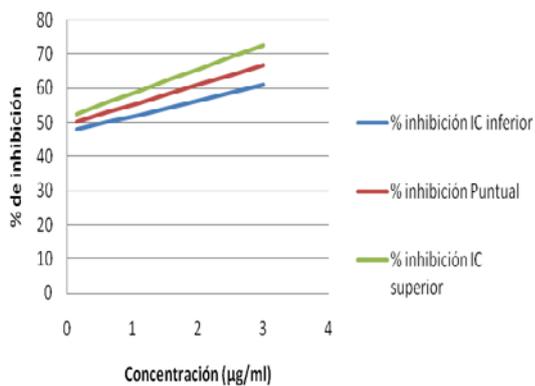
*P. alliacea* raíz extracto acuoso



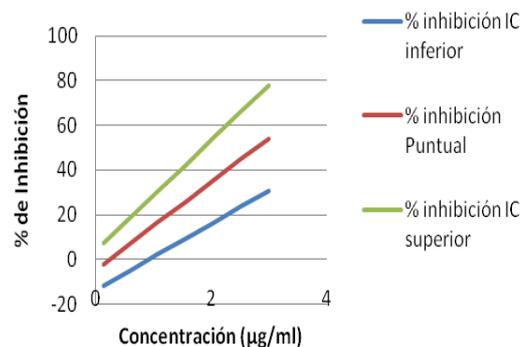
*P. alliacea* raíz extracto etanólico



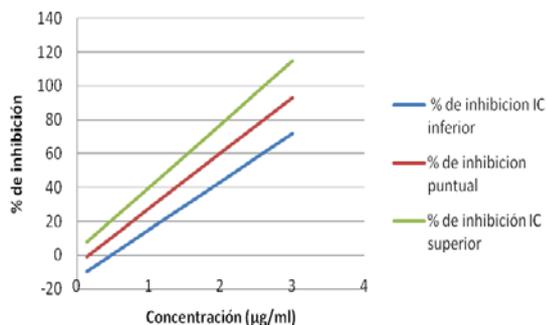
*S. domingensis* fruto extracto acuoso



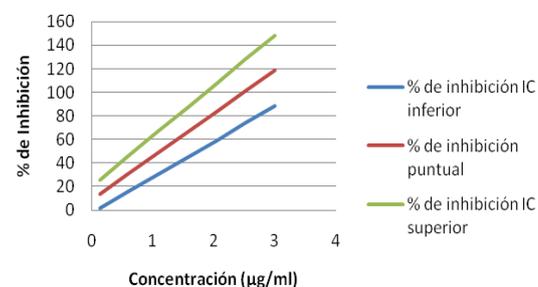
*S. domingensis* Fruto extracto etanólico

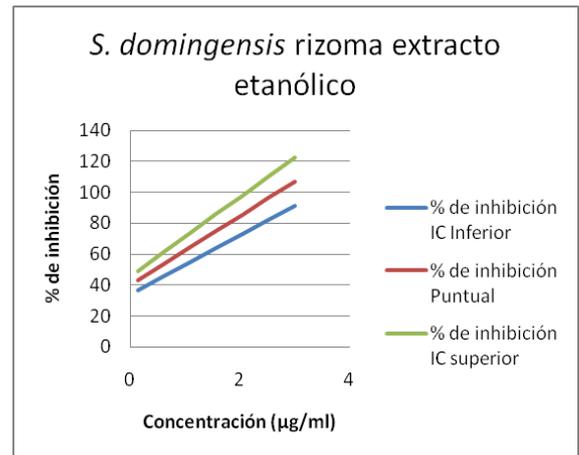
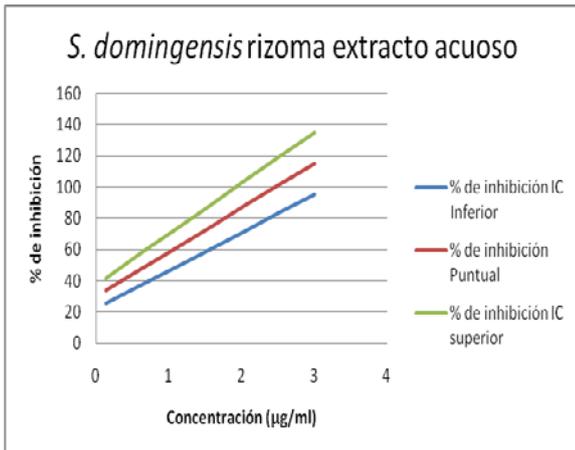


*S. domingensis* hoja extracto acuoso

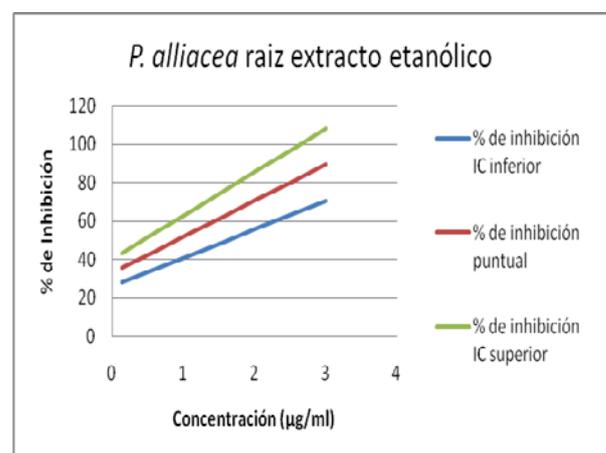
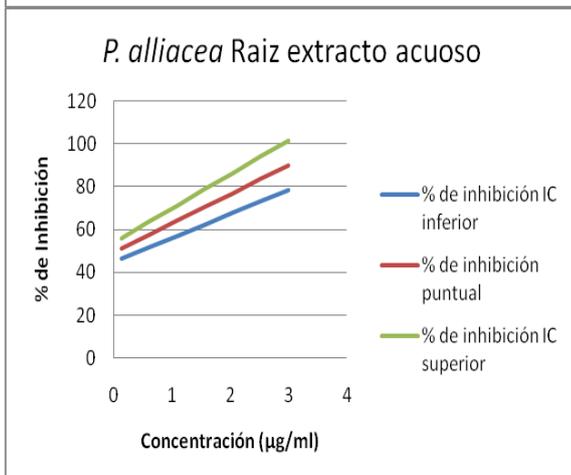
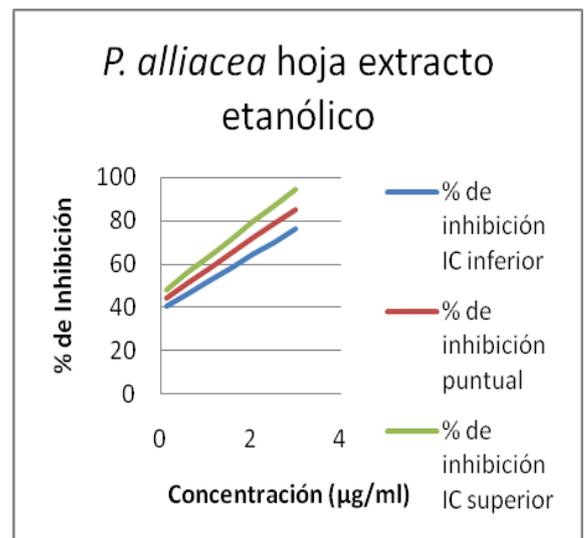
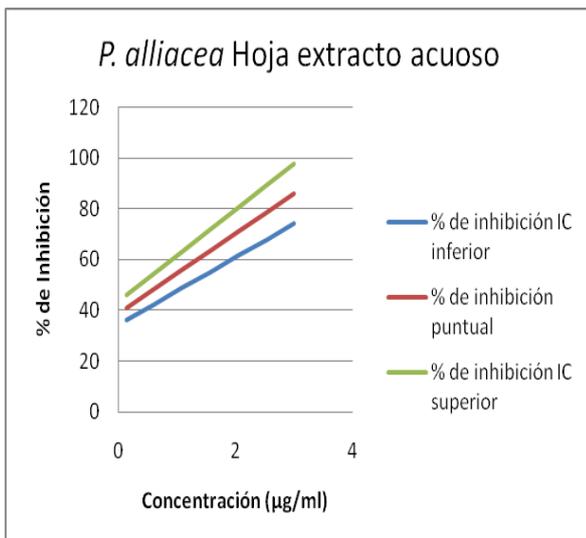


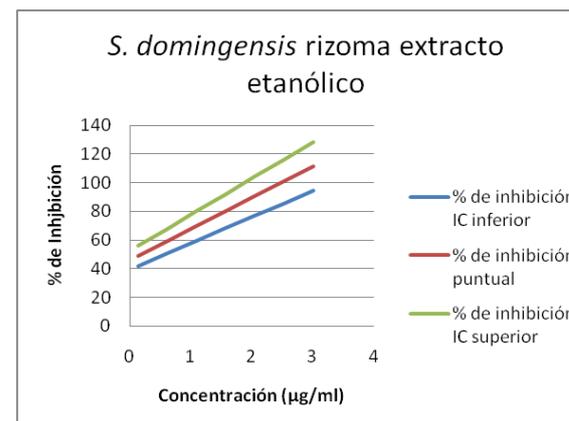
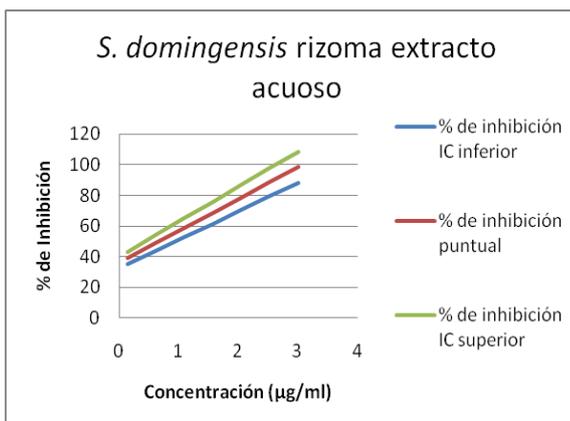
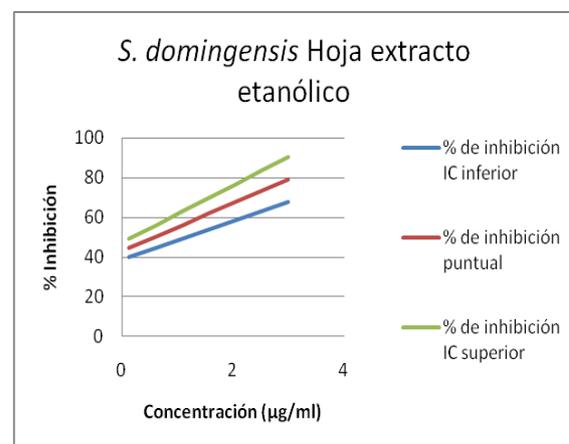
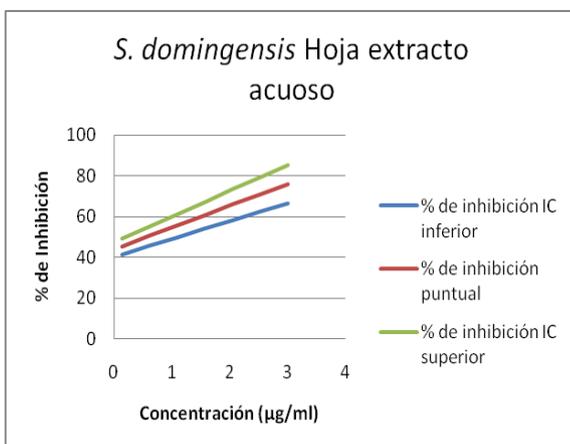
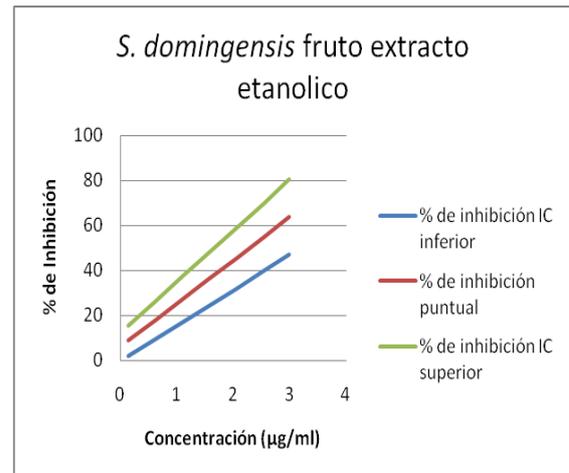
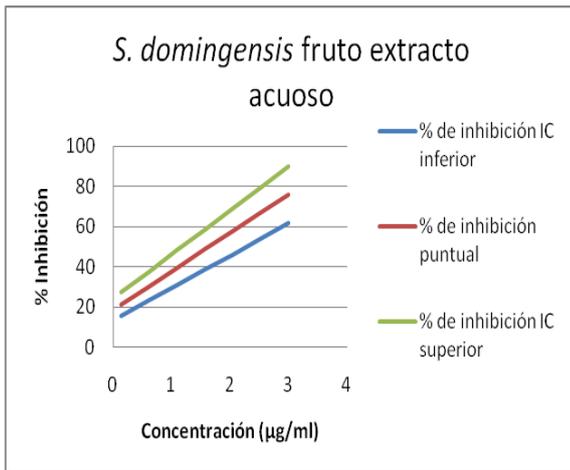
*S. domingensis* hoja extracto etanólico



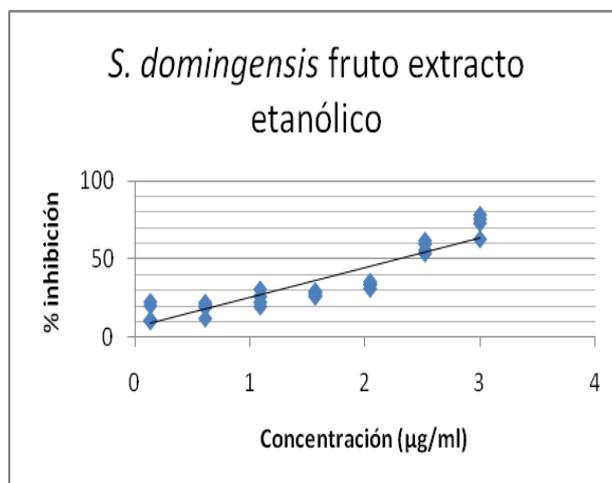
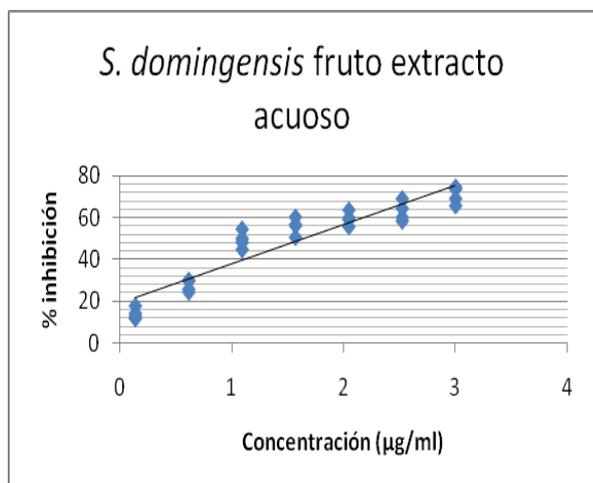
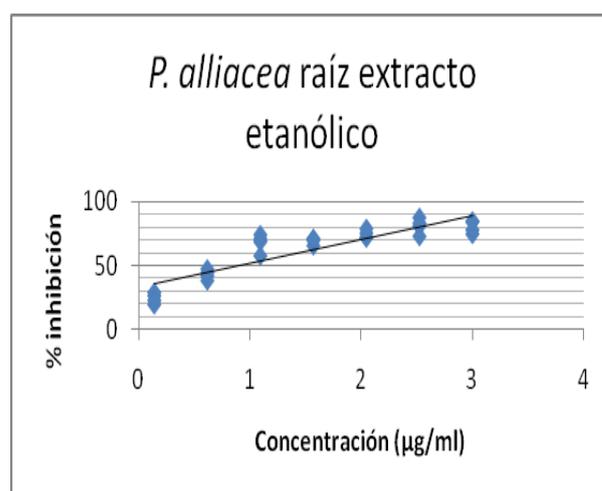
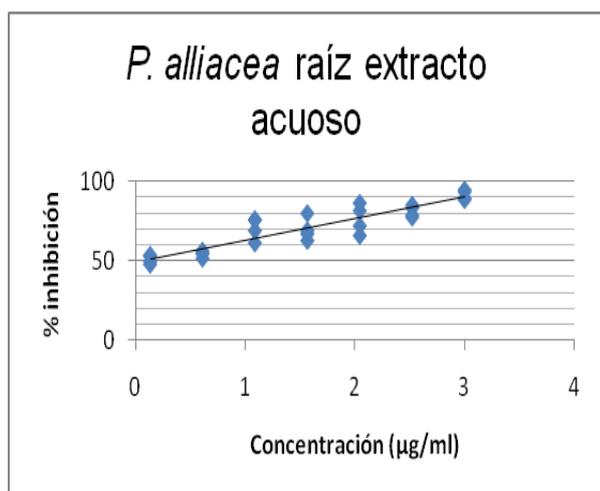
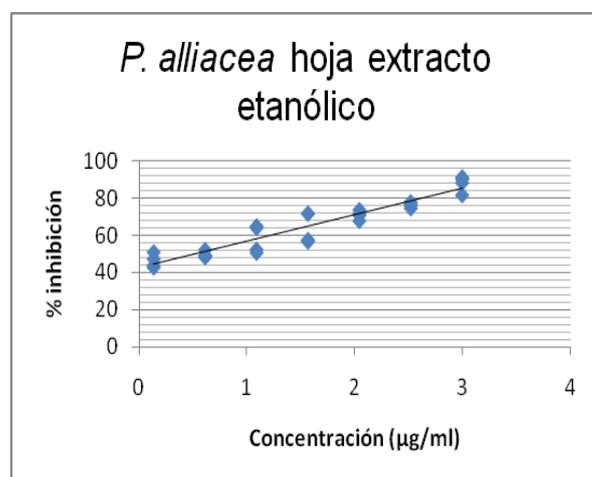
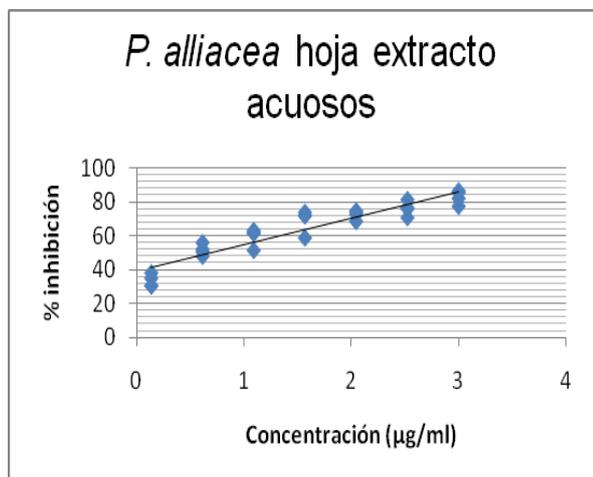


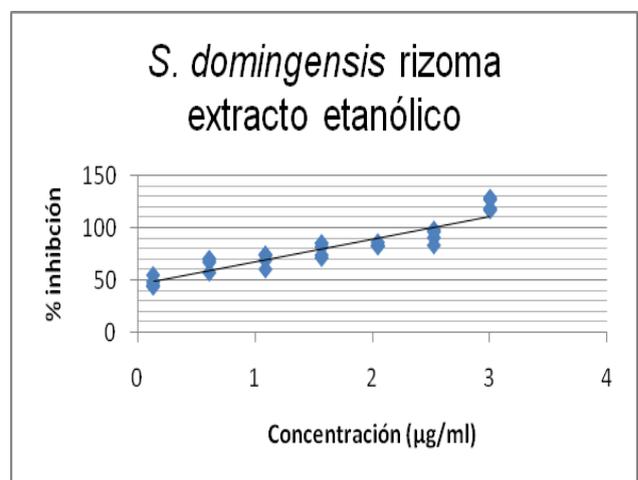
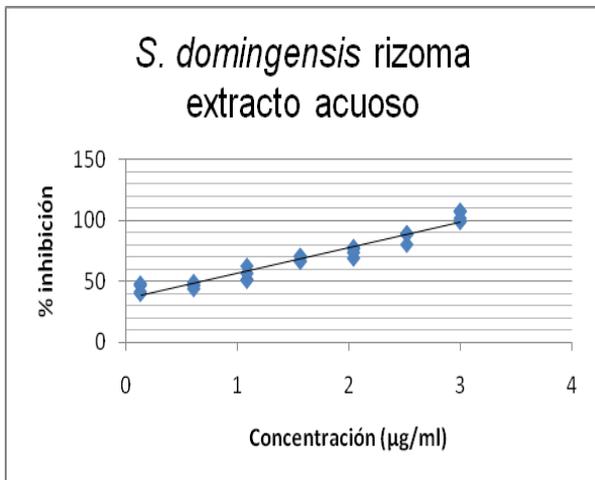
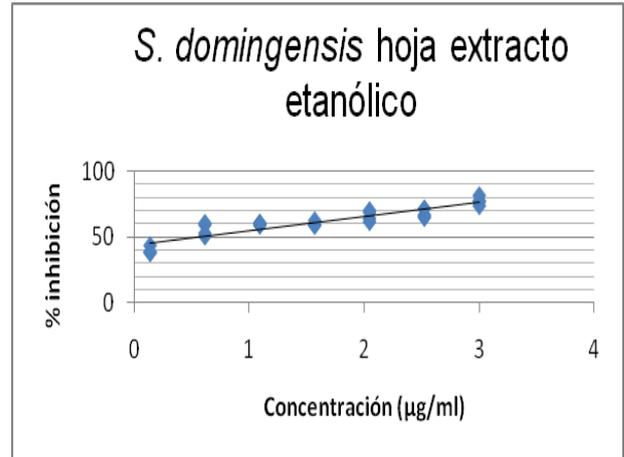
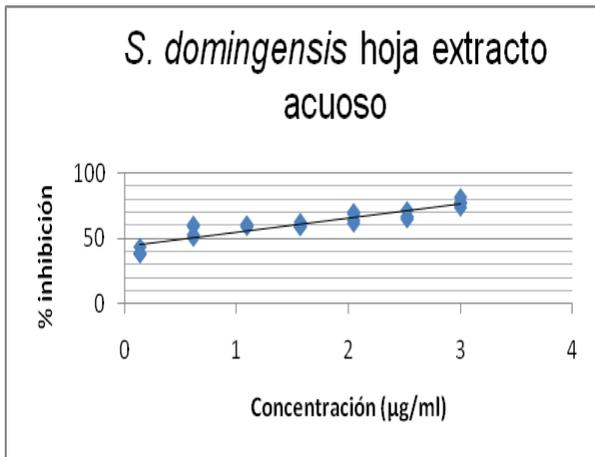
### 13.3 GRÁFICAS DE INTERVALOS DE CONFIANZA VÍA ALTERNA DEL COMPLEMENTO



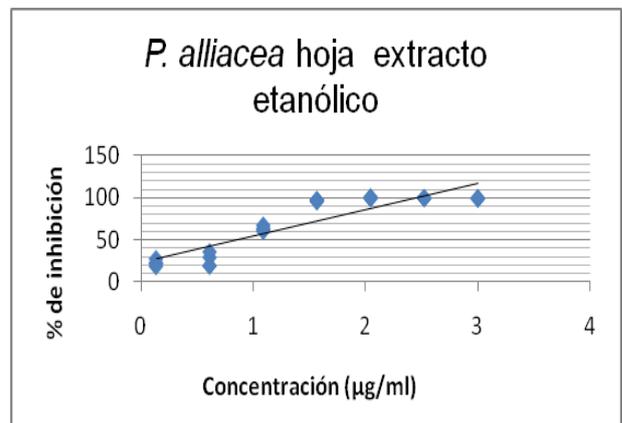
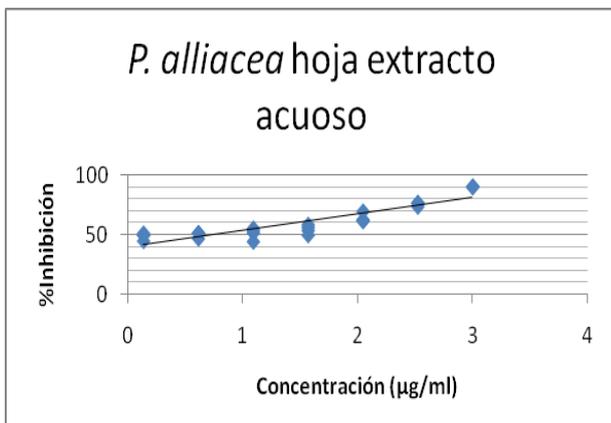


**13.4 GRÁFICAS DE DISPERSIÓN LA ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *P. alliacea* Y *S. domingensis* SOBRE LA VÍA ALTERNA DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO.**

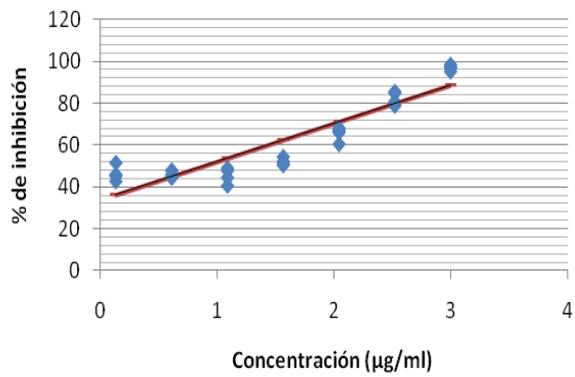




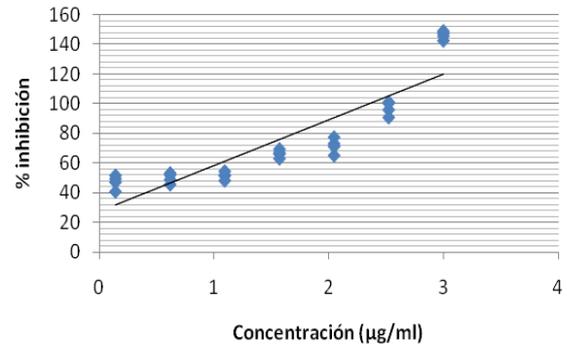
**13.5 GRÁFICAS DE DISPERSIÓN LA ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *P. alliacea* Y *S. domingensis* SOBRE LA VÍA CLÁSICA DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO.**



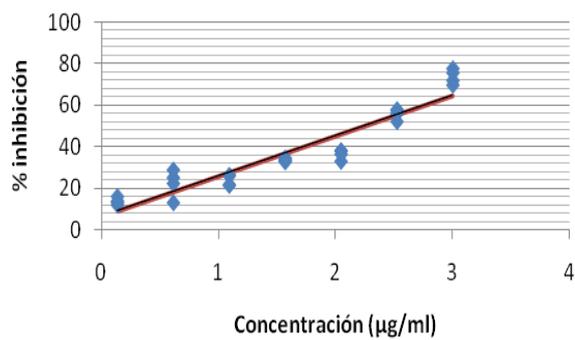
*P. alliacea* raíz extracto acuoso



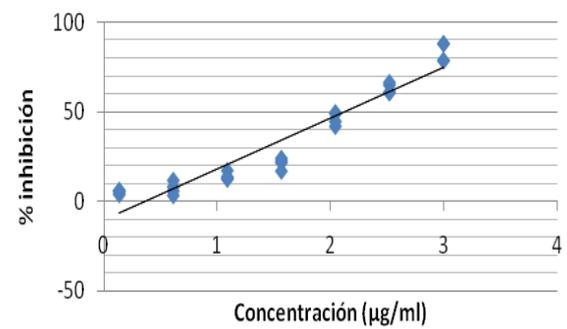
*P. alliacea* raíz extracto etanólico



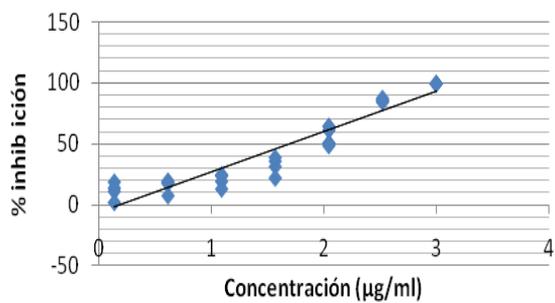
*S. domingensis* fruto extracto acuoso



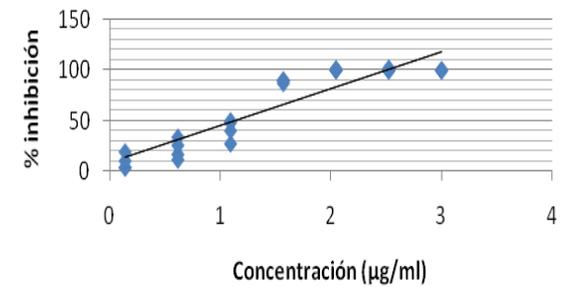
*S. domingensis* fruto extracto etanólico



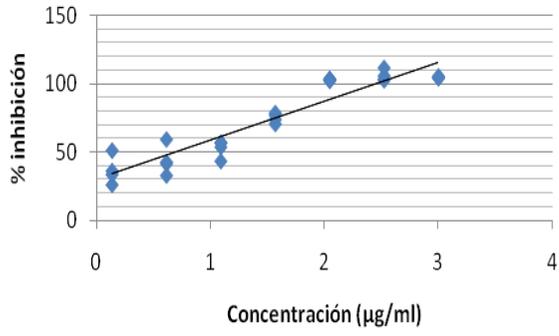
*S. domingensis* hoja extracto acuoso



*S. domingensis* hoja extracto etanólico



*S. domingensis* rizoma  
extracto acuoso



*S. domingensis* rizoma  
extracto etanólico

