

**Mejor Tesis: ESCUELA DE QUIMICA BIOLOGICA<sup>a</sup>**

**EFFECTO DE CINCO EXTRACTOS DE PLANTAS NATIVAS USADAS COMO ADAPTOGENOS EN LA ACTIVIDAD LINFOPROLIFERATIVA IN VITRO**

N. Meza<sup>1</sup>, M. Paredes<sup>2</sup> y A. Cáceres<sup>3</sup>.

Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,  
 Escuela de Química Biológica, Departamento de Citohistología.

**RESUMEN**

En el presente estudio se utilizaron cinco extractos de plantas nativas usadas popularmente como adaptógenos: hojas de *Baccharis trinervis* (Hierba de Santo Domingo), hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance), hojas de *Neurolaena lobata* (Tres Puntas) y los rizomas de *Smilax domingensis* y *Smilax spinosa* (Zanaguarrilla), para demostrar la posible actividad inmunomoduladora a través de la linfoproliferación in vitro.

Todos los extractos etanólicos fueron evaluados sobre un cultivo de linfocitos de sangre periférica humana utilizando una concentración de 1 mg/ml de extracto. Inicialmente el ensayo microtético fue el utilizado para evaluar la actividad de los extractos sobre los linfocitos, sin embargo no fue posible validar, por lo que se procedió a validar el método manual (conteo directo de los linfocitos); en el ensayo se realizó con este método.

De todos los extractos estudiados los que presentaron actividad inmunosupresora fueron las hojas de *B. crassifolia* y el rizoma de *S. spinosa*. A estos extractos se les determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) confrontándolos a diferentes concentraciones: 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 µg/ml. La CIM para *B. crassifolia* fue de 62.5 µg/ml y para *S. spinosa* de 125 µg/ml.

**INTRODUCCIÓN**

La vida humana es una lucha constante y permanente la muerte que acecha bajo las más

extrañas e insospechadas formas. Muchas veces el tratamiento de las condiciones patológicas se ve afectado por factores como la disponibilidad, el acceso, costo, duración, resistencia y efectos secundarios de los fármacos. El hombre actual, en el ámbito de la civilización técnica e industrial altamente desarrollada ha llegado a ser en gran escala el explorador de la naturaleza y debe tratarla de manera utilitaria aprovechando sus riquezas sin destruirlas. En los últimos años ha surgido un renovado interés por la Medicina Natural y se han establecido métodos y técnicas experimentales para valorar científicamente su aplicación en el tratamiento de las diversas condiciones patológicas (1). El hombre y los animales normalmente no sufren el impacto de los agentes patógenos y de todos aquellos agresores reales o potenciales que los rodean, ello se debe a que poseen mecanismos defensivos protectores que le aseguran cierta integridad y sólo por fallas de éstos se producen infecciones o agresiones. La mayor parte de estos mecanismos defensivos pertenecen al sistema inmunitario, la otra a las barreras naturales (2,3). De ahí que, la baja o defectuosa respuesta inmunitaria aumenta la susceptibilidad a infecciones, elevando las infecciones recurrentes, facilitando infecciones por agentes infecciosos poco comunes e inclusive induciendo al desarrollo de infecciones crónicas. Se han descubierto cantidades crecientes de enfermedades causadas por respuestas inmunitarias aberrantes. Todo esto ha provocado la búsqueda de medicamentos capaces de inhibir estas reacciones no deseadas, así como de aquellos capaces de estimular la respuesta inmunitaria.

En Guatemala, existe una diversidad de

<sup>a</sup> Este artículo fue seleccionado como la mejor tesis de esta escuela.

plantas a las que se les atribuyen propiedades medicinales (4). Con estas realidades precursoras, el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA y el Departamento de Citohistología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC, presentaron una propuesta para estudiar la actividad inmunomoduladora de plantas nativas. Las plantas se seleccionaron en base a la literatura específica sobre etnobotánica medicinal de la región.

### MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo, se procedió con el reto linfoproliferativo que consistió en tratar los linfocitos de sangre periférica humana con los extractos, a fin de determinar su actividad inmunomoduladora a través de un ensayo manual, donde un aumento o disminución de linfocitos respecto a un control es un dato significativo, demostrativo de inmunomodulación (5,6).

**Obtención de linfocitos:** La obtención de linfocitos, de un donador sano al momento de la extracción, se llevó a cabo a través de una columna con gradientes de densidad (Histopaque). Se preparó la suspensión con RPMI-FBS llevándola a una concentración aproximada de  $5 \times 10^6$  células/mL(7).

**Conteo celular:** La metodología se basa en un conteo celular directo, que es la determinación de células sanguíneas por unidad de volumen. Para determinar la actividad de los extractos se procedió al conteo celular de cada extracto, el control negativo y la

lectina, el día de la preparación como control, para luego volver a ejecutar el conteo al 7° día y proceder así a comparar los resultados. Un resultado se considera positivo cuando los extractos producen un aumento o disminución del recuento comparado con la lectina y el control negativo.

### RESULTADOS

Se validó la metodología con dos lectinas cuya actividad ya es conocida científicamente, incluyendo una blanco como control negativo.

Tabla No. 1

#### Validación del método manual

Lectina	Actividad al 7° día
<i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)	E*++
<i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)	E++
Control	

\*E: estimulación

#### Actividad de los extractos en estudio

De acuerdo con el análisis efectuado con cada uno de los extractos se confeccionó la siguiente tabla de resultados:

Tabla No. 2

#### Actividad inmunomoduladora de los extractos etanólicos

Nombre científico	Nombre común	Parte anatómica	Actividad 1 mg/ml
<i>Baccharis trinervis</i>	Hierba de Santo Domingo	Hojas	-
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Nance	hojas	I*+++
<i>Neurolaena lobata</i>	Tres Puntas	Hojas	-
<i>Smilax domingensis</i>	Zarzaparrilla	Rizoma	-
<i>Smilax spinosa</i>	Zarzaparrilla	Rizoma	I++

\* I: Inhibición

**Determinación de la Concentración Efectiva Mínima (CEM)**

A los extractos que mostraron actividad

inmunomoduladora se les determinó la CEM confrontándolos a diferentes concentraciones: 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.7 µg/mL.

Tabla No. 3

Determinación de la Concentración Efectiva Mínima de los extractos de *B. crassifolia* y *S. spinosa*

Extractos	500 µg/ml	260 µg/ml	125 µg/ml	31.2 µg/ml	15.7 µg/ml
<i>B. crassifolia</i>	+++	+++	++	+	+/- -
<i>S. spinosa</i>	++	++	+	+/-	-

**DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Se ensayaron dos metodologías para validar el ensayo inmunomodulador; la primera fue determinando el crecimiento celular mediante un espectrofotómetro a través de la transformación de un sustrato de tetrazolio por el linfocito viable y la lectura espectrofotométrica. Sin embargo no se utilizó porque no se contaba con el agente reactivo PMS (Metosulfato de phenacina), para detectar la reacción del cromógeno (XTT)(8). Como alternativa se utilizó la lectura de absorbancia del XTT, validando la metodología manual que consiste en realizar una dilución para posterior recuento celular en una cámara cuentaglóbulos y un ensayo convencional. Este ensayo presenta la ventaja que es posible determinar la viabilidad celular, es un ensayo laborioso y tardado. Para validar la metodología se utilizaron dos lectinas como reactivos: ConA y PHA, incluyendo un control negativo. Los resultados indicaron que ambas lectinas actuaron como estimulantes; se observó que Con A

tiene una actividad más marcada, ya que presentó un porcentaje de estimulación de 180%, mientras que el de PHA fue de 138%, por lo que se procedió a continuar el ensayo con Con A. Igualmente se estimó el índice de estimulación (proliferación mayor que el nivel basal) o inhibición (proliferación menor que el nivel basal) de cada extracto.

Los extractos que presentaron actividad con la concentración inicial de 1 mg/ml fueron: la hoja de *B. crassifolia* y el rizoma de *S. spinosa*, éstos presentaron un porcentaje de inhibición de 76-100% (I+++ y 51-75% (I++), respectivamente. El extracto de *B. crassifolia* mostró una CEM de 62.5 µg/ml y el de *S. spinosa* de 125 µg/ml.

Los resultados obtenidos apoyan el uso popular de *B. crassifolia* y *S. spinosa* ya que entre los usos reportados en la literatura podemos mencionar el tratamiento de la hinchazón, alergias, eczema, psoriasis e inflamación, que son procesos que involucran un mecanismo de acción inmunológica (4,9).

REFERENCIAS

1. Guzmán AM. Retorno a la Medicina Tradicional. *Crítica* 1991; 32:37-38.
2. Margni R. Fundamentos de Inmunología e Inmunoquímica. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1996. 970p.
3. Stites DP, Terr A I. Inmunología Básica y Clínica. 7ed. Carsolio M, trad. México: Manual Moderno, 1993. 946p.
4. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. 402p.
5. Swain SL. The Activation and Differentiation of T Cells. *The Immunologist* 1995;3:5-6
6. Atal CK et al. Immunomodulating Agents of Plant Origin. Preliminary Screening. *J. Ethopharmacol.* 1986;18:133-141.
7. CYTED Workshop "Drug Discovery and Drug Immunomodulation of Natural Products". Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Utrecht, Holanda: 1995.
8. Scudiero DA *et. al.* Evaluation of Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res.* 1988;48:4827-4833.
9. Rastrelli L. *et. al.* Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry* 1997;45:647-650.