

ACTIVIDAD MODULADORA DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO DE DIEZ PLANTAS MEDICINALES NATIVAS DE GUATEMALA

Claudia Castillo, Annabella Osorio, Ana Margarita Paz y Armando Cáceres
Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Universidad de San Carlos de Guatemala.

RESUMEN

El presente estudio evaluó la actividad moduladora *in vitro* de las vías clásica y alterna del sistema de complemento de extractos etanólicos de diez plantas medicinales nativas de Guatemala aplicando técnicas de ensayos hemolíticos. Los extractos utilizados fueron flor y raíz de *Dorstenia contrajerva* (contrahierba), tallo de *Quercus crispifolia* (encino), hojas de *Cornutia pyramidata* (jorokté), *Simarouba glauca* (aceituno), *Phlebodium pseudoaureum* (calahuala), *Lippia graveolens* (orégano), *Neurolaena lobata* (tres puntas), *Solanum americanum* (hierba mora), hoja y raíz de *Petiveria alliacea* (apacín) y corteza de *Rhizophora mangle* (mangle) las cuales demostraron en estudios anteriores actividad antiprotzoaria. Los extractos que presentaron actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema de complemento son raíz de *D. contrajerva* ($CI_{50} = 12.50 \mu\text{g/mL}$), hojas de *P. pseudoaureum* ($CI_{50} = 10.50 \mu\text{g/mL}$), hojas de *S. glauca* ($CI_{50} = 5.50 \mu\text{g/mL}$), hojas de *P. alliacea* ($CI_{50} = 5 \text{ mg/mL}$), raíz de *P. alliacea* ($CI_{50} = 14 \text{ mg/mL}$) y hojas de *S. americanum* ($CI_{50} = 8 \text{ mg/mL}$). Respecto a la vía alterna del complemento presentaron efecto activador las hojas de *P. pseudoaureum* ($CI_{50} = 6.17 \mu\text{g/mL}$), hojas de *P. alliacea* ($CI_{50} = 7 \text{ mg/mL}$), raíz de *P. alliacea* ($CI_{50} = 6 \text{ mg/mL}$), hojas de *S. americanum* ($CI_{50} = 14 \text{ mg/mL}$) y hojas de *S. glauca* ($CI_{50} = 10.00 \mu\text{g/mL}$).

INTRODUCCIÓN

El ser humano constantemente está expuesto a una gran diversidad de sustancias y agentes extraños que se encuentran en el ambiente con el potencial de causar enfermedad. El organismo para lograr mantenerse sano, ha desarrollado un sistema complejo y efectivo el cual se encarga de combatir estas infecciones, el sistema inmune. Este es el encargado de proteger y mantener la integridad del organismo, mediante tres funciones básicas: distinción entre lo propio y lo extraño, especificidad y memoria (1-4).

El cuerpo humano posee una serie de barreras naturales las cuales brindan protección contra los microorganismos patógenos evitando las infecciones. Si algún agente patógeno logra atravesar estas barreras, se pone en marcha la respuesta inmune, la cual consiste en una secuencia integrada y regulada de una serie de mecanismos heterogéneos de defensa (1, 5).

Los componentes involucrados en la respuesta inmune pueden ser divididos en factores humorales y celulares; uno de ellos es el sistema del complemento, el cual es un complejo constituido por 30 proteínas solubles, las cuales interactúan entre sí de modo regulado formando una cascada enzimática, en la cual el producto de una reacción cataliza al próximo producto permitiendo la amplificación de la respuesta humoral. Las consecuencias de la activación y fijación del complemento incluyen: lisis del microorganismo, opsonización, quimiotaxis,

amplificación de la respuesta humoral y eliminación de inmunocomplejos (1,6).

El sistema del complemento está compuesto por cuatro unidades funcionales: la vía clásica (VC), la vía alterna (VA), la unidad de amplificación y la ruta terminal. La clásica y la alterna son las vías principales de activación, ambas funcionan a través de la interacción de proteínas y proceden por activación secuencial y ensamblaje de una serie de componentes. Esto conduce a la formación de complejos enzimáticos capaces de unirse y romper el componente clave, el C3 y comparten la fase final que consiste en el ensamblaje del denominado complejo de ataque a la membrana sobre la superficie del microorganismo que va a producir la lisis de la célula (1, 7, 8).

Los ensayos *in vitro* para la valoración de la actividad del sistema de complemento se fundamentan en la hemólisis del eritrocito por el complejo de ataque a la membrana el cual es generado al activarse el sistema. Los eritrocitos actúan como activadores y como células blanco, ya que poseen antígenos de superficie que reaccionan con anticuerpos específicos y su lisis da lugar a la liberación de hemoglobina la cual es cuantificable por métodos colorimétricos. La hemólisis es medida como la absorbancia de la hemoglobina liberada. De los datos obtenidos se calcula el porcentaje de inhibición y la CI_{50} , que es una unidad (unidad de Mayer) definida como la cantidad del complemento necesaria para provocar la lisis de 50% de los eritrocitos, en condiciones estandarizadas (1, 9-11).

Los inmunomoduladores son compuestos que modifican la respuesta biológica y afectan la respuesta inmune, amplificándola o inhibiéndola por lo que son clasificados como inmunostimulantes o inmunosupresores. El objetivo de reconocer estos compuestos es el de regular químicamente la actividad del sistema inmune (1, 12-15).

Los inmunomoduladores derivados de productos naturales son una alternativa para regular el sistema inmunitario. Dentro de la Farmacobotánica se lleva a cabo esta búsqueda, estudiando la utilización de productos vegetales con finalidad terapéutica que puedan usarse en la Fitoterapia. La base de los medicamentos fitoterapéuticos son las drogas vegetales y los diferentes productos que de ellas se obtienen. Estos productos abarcan todos los principios activos, como complejos proteicos, enzimas, elementos naturales como el hierro, cobre, flúor y otros metabolitos primarios. En la búsqueda de estos principios se utilizan los diferentes órganos de las plantas como raíz, rizoma, hojas, frutos, flores, semillas, tejidos como el corcho y madera, gomas y resinas obtenidas por incisiones en las plantas (16-20).

La condición geográfica y climática de Guatemala hace de esta región una fuente rica en diversidad vegetal. A partir de 1977 se inició la recopilación y documentación sobre plantas medicinales y con el tiempo se ha logrado la estandarización de metodologías de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar sus propiedades antimicrobianas (3, 21).

En Guatemala la principal fuente de información sobre el uso de las plantas medicinales antiprotozoarias es la medicina tradicional, además de diversos estudios nacionales y a nivel mundial del uso de plantas para dichas infecciones (22-23).

Las plantas estudiadas en el presente trabajo fueron seleccionadas por haber mostrado actividad antiprotozoaria, ya que el mecanismo sugiere la activación del complemento, conduciendo a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y por lo tanto, la lisis de la célula infectada y la muerte del parásito (1).

El objetivo principal del estudio fue demostrar la actividad inmunomoduladora *in vitro* de los extractos etanólicos de diez plantas de Guatemala sobre el sistema del complemento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extractos de plantas

Se pesaron 2 mg de los extractos etanólicos de las plantas en estudio y se diluyeron en 4 mL de VSB⁺2 para la vía clásica (VC) y en 4 mL EGTA-VB para la vía alterna (VA).

Suero

Se recolectó una mezcla de suero humano (MSH) de donadores voluntarios sanos como fuente de complemento.

Eritrocitos

Se realizó una dilución 1:2 de eritrocitos de carnero (ShE) para la VC y de conejo (RaE) para VA en solución de Alsever que sirvió como fuente de transporte, y se lavaron tres veces con solución salina previamente a su utilización.

Se preparó la suspensión de ShE en VSB⁺2 obteniéndose una concentración de 4×10^8 cel/mL y estos fueron sensibilizados con anticuerpos monoclonales anti-ShE (amboceptor) e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, a los eritrocitos sensibilizados se llaman ShEa, la suspensión se lavó dos veces con VSB⁺2 y resuspendidos en la misma solución tampón llegando a una concentración final de 2×10^8 cel/mL.

Los RaE son suspendidos en EGTA-VB, no se sensibilizan y se llega a la misma concentración final de eritrocitos.

Ensayos hemolíticos para valorar la actividad sobre el sistema del complemento

La metodología empleada fue el microensayo modificado que describió Klerx *et al.* (26). (Figura 1).

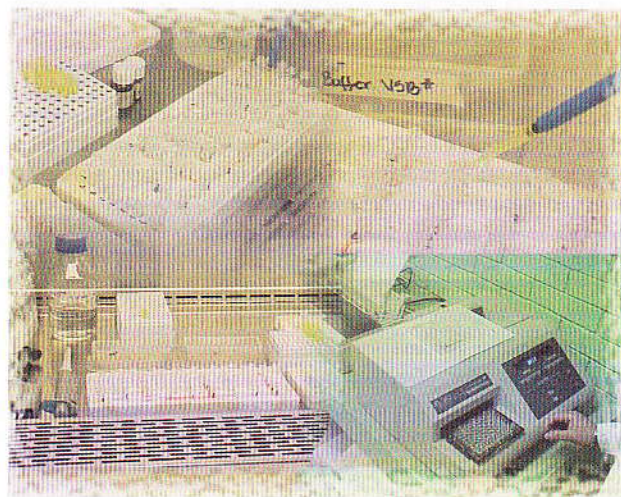


Figura 1 Material y equipo usado para el bioensayo

Para la determinación de la actividad inmunomoduladora de la VC se empleó ShE sensibilizados con anticuerpos anti-ShE, esta reacción antígeno anticuerpo activa los componentes de la vía clásica presente en ella. El amortiguador utilizado contiene los cationes divalentes de Ca^{+2} y Mg^{+2} necesarios para la activación de esta vía (VSB⁺).

En la determinación de la actividad de la VA es necesario que la vía clásica, que es dependiente de calcio, se inactive, lo cual se logró con la adición del amortiguador del cual posee ácido etilenglicol tetracético (EGTA), que es utilizado como agente quelante de calcio y magnesio que es indispensable para la activación de esta vía. Se utilizó la mezcla de suero humano y RaE los cuales poseen membranas activadas, que permiten la protección del complejo C3Bb del factor H permitiendo el ensamblaje al complejo de ataque a la membrana.

Los ensayos se realizaron en tubos Eppendorf (simulando una microplaca); se adicionó 100 μ L de los extractos de planta en las filas respectivas (A). Se agregó 50 μ L de la dilución de MSH (concentración 1:80) diluido en VSB⁺ para la VC o 25 μ L de MSH a una concentración de 1:3 diluido en EGTA-VB para la VA. La microplaca se preincubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se añadió 50 μ L de ShEa para la VC o 25 μ L de RaE para la VA; y la microplaca fue incubada por 60 minutos para la VC o por 30 minutos para la VA. Después de la incubación los tubos se centrifugaron a 2500 rpm por 2 minutos para sedimentar las células intactas y dañadas. Para la determinación del grado de hemólisis, 50 μ L de los sobrenadantes se mezclaron con 200 μ L de agua destilada en una microplaca de fondo plano y se midió la absorbancia utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm.

Se emplearon controles en los cuales se midió la actividad sérica o inhibición del complemento utilizando suero diluido en VSB⁺ y ShEa para la VC o suero diluido en EGTA-VB y RaE para la VA, la hemólisis al 0% sólo utilizó la solución amortiguadora y los eritrocitos (ShEa o RaE) y con la hemólisis al 100% se usó agua destilada y los eritrocitos.

RESULTADOS

La Tabla 1 resume los principales resultados obtenidos durante el estudio. Destaca que *P. alliacea* (hoja y raíz), *P. pseudoaureum* (hoja), *S. americanum* (hoja) y *S. glauca* (hoja) (Fig. 2) presentan actividad inhibitoria de la vía clásica y actividad estimuladora de la vía alterna; la raíz de *D. contrajerva* posee actividad inhibitoria sobre la vía clásica, pero es inactiva en la vía alterna. Finalmente *C. pyramidata* (hoja), *L. graveolens* (hoja), *N. lobata* (hoja), *Q. crispifolia* (tallo) y *R. mangle* (corteza) no demostraron ningún tipo de actividad en ambas vías.

Los resultados fueron obtenidos a partir del cálculo de CI_{50} (concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria) de los extractos de las plantas a distintas concentraciones.

Tabla 1. Actividad Moduladora del Sistema de Complemento

Planta	Vía Clásica	Vía Alterna
<i>C. pyramidata</i> (hoja)	No activa	No activa
<i>D. contrajerva</i> (flor)	No activa	No activa
<i>D. contrajerva</i> (raíz)	Inhibidora	No activa
<i>L. graveolens</i> (hoja)	No activa	No activa
<i>N. lobata</i> (hoja)	No activa	No activa
<i>P. alliacea</i> (hoja)	Inhibidora	Estimuladora
<i>P. alliacea</i> (raíz)	Inhibidora	Estimuladora
<i>P. pseudoaureum</i> (hoja)	Inhibidora	Estimuladora
<i>Q. crispifolia</i> (tallo)	No activa	No activa
<i>R. mangle</i> (corteza)	No activa	No activa
<i>S. americanum</i> (hoja)	Inhibidora	Estimuladora
<i>S. glauca</i> (hoja)	Inhibidora	Estimuladora

En la Tabla 2 se presentan los valores de CI_{50} obtenidos. A simple vista estos sugieren que todas las plantas estudiadas presentan algún tipo de actividad. Sin embargo cada valor, al ser comparado con el de punto de corte establecido (15 μ g/mL) permite la clasificación de cada planta como activa o inactiva. Se considera activo un extracto con un valor por debajo del punto de corte.

En la vía alterna la flor de *D. contrajerva*, las hojas de *C. pyramidata*, *L. graveolens*, *N. lobata*, el tallo de *Q. crispifolia* y la corteza de *R. mangle* se reportan como negativas, lo que indica que los extractos no fueron capaces de causar lisis eritrocitaria del 50%.

Tabla 2. Determinación de CI_{50}

Planta	Vía Clásica	Vía Alterna
<i>D. contrajerva</i> (flor)	58 μ g/mL	Negativo
<i>D. contrajerva</i> (raíz)	12.50 μ g/mL	18.51 μ g/mL
<i>P. pseudoaureum</i> (hoja)	10.50 μ g/mL	6.17 μ g/mL
<i>Q. crispifolia</i> (tallo)	40.50 μ g/mL	Negativo
<i>C. pyramidata</i> (hoja)	110.0 μ g/mL	Negativo
<i>S. glauca</i> (hoja)	5.50 μ g/mL	10.00 μ g/mL
<i>P. alliacea</i> (hoja)	5.00 μ g/mL	7.00 μ g/mL
<i>P. alliacea</i> (raíz)	14.00 μ g/mL	5.00 μ g/mL
<i>S. americanum</i> (hoja)	8.00 μ g/mL	14.00 μ g/mL

DISCUSIÓN

De las diez plantas estudiadas, cinco presentaron actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema del complemento, la raíz de *D. contrajerva*, la hoja y raíz de *P. alliacea*, las hojas de *P. pseudoaureum*, *S. americanum* y *S. glauca*. Respecto a la vía alterna las hojas de *P. aureum*, la hoja y raíz de *P. alliacea* y la hoja de *S. glauca* presentan efecto activador.

La hoja de *C. pyramidata*, flor de *D. contrajerva*, hoja de *L. graveolens*, hoja de *N. lobata*, tallo de *Q. crispifolia* y corteza de *R. mangle* no presentaron ninguna actividad sobre la vía clásica y la vía alterna, a esto se suma la raíz de *D. contrajerva* que tampoco presentó actividad sobre la vía alterna.

La actividad inhibitoria que algunos extractos evidencian puede deberse a muchas causas, entre las cuales se mencionan la interferencia de los componentes C1, C2, C3, C4 e IgG, la quelación de los cationes divalentes (Ca^{+2} o Mg^{+2}), los lipopolisacáridos presentes en las membranas de las bacterias Gram negativo o bien mediante la estimulación de reguladores y/o inhibidores de la activación de la vía clásica del sistema de complemento entre otros.

La determinación de CI_{50} se estableció considerando un límite de 15 $\mu\text{g/mL}$ como punto significativo de corte. Este punto es especialmente útil en la vía alterna dada su alta susceptibilidad de ser activada a bajas concentraciones de sustancias contaminantes que podrían producir resultados inespecíficos. Por lo tanto se considera este valor para discriminar la actividad inespecífica del extracto o efectos de sustancias interferentes tales como bacterias, hongos, polisacáridos, alcaloides entre otros presentes al momento del ensayo (24, 25).

Los resultados obtenidos confirman lo reportado en la literatura con respecto a *P. pseudoaureum* donde se describe como planta inmunomoduladora (21).

El método fue modificado en la concentración inicial a la que se trabajó, la que fue de 500 $\mu\text{g/mL}$ seguida de diluciones seriadas desde 1:3 hasta llegar a 1:729 (0.69 $\mu\text{g/mL}$). Se tomó esta decisión en virtud que actualmente la industria farmacéutica utiliza las cantidades de principio activo en sus productos en el orden de μg . Además al utilizar concentraciones menores de 1 mg/mL se evitaron posibles interferencias causadas por los pigmentos propios de cada extracto.

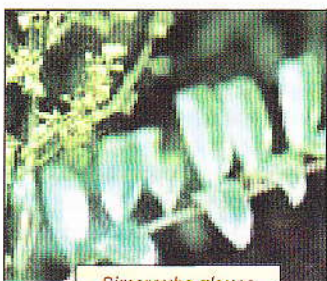
Los datos obtenidos conllevan a considerar que los extractos etanólicos de las plantas evaluadas que dieron resultados positivos son de interés y promisorios. Estos ameritan investigaciones más profundas que tomen como base los presentes resultados y de ellos se parta para procesos de fraccionamiento y determinación de las fracciones que posean el principio activo útil, el que posteriormente deberá ser aislado y utilizado en pruebas *in vivo* y ensayos clínicos. Estos finalmente deberán ser evaluados respecto a su seguridad y aplicación como inmunomoduladores.



Solanum americanum



Petiveria alliacea



Simarouba glauca

Figura 2. Fotografías de las plantas con bioactividad

Las plantas evaluadas tradicionalmente han sido un recurso utilizado gracias a sus propiedades medicinales como actividad antiprotozoaria, antiinflamatoria, antiséptica y en afecciones gastrointestinales, entre otras.

Los datos obtenidos apoyan su uso y justifica una investigación más profunda de estas plantas, así como de muchas otras posibilidades que ofrece la biodiversidad de Guatemala.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Citohistología, al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya, al proyecto Flora Regional de OEA y a las Licidas. María Eugenia Paredes, María Paula de León, Luisa Fernanda Lemus, Dr. Denis Urizar y Sra. Norma Sánchez (QEPD).

REFERENCIAS

1. Stites D, Terr A. Inmunología Básica y Clínica, 9 ed. Mérito A. Trad. México: Manual Moderno, 1998. 1080p.
2. Margani R. La Respuesta Inmune. Revista de Divulgación y Tecnología de la Asociación Ciencia hoy, 1997; 6(36):6-11.
3. Laboratorios Gramon. Bases de fitoterapia. Buenos Aires Argentina. Disponible en www.gramon.com.ar/fito/fitoterapia.htm
4. Cagigas y col. Complemento hemolítico como indicador del estado inmunológico de niños con desnutrición energético-proteica aguda. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 1999; 13(1):29-32.
5. Universidad de Perú. Fundamentos básicos de Inmunología. Perú. Disponible en www.upch.edu.pe/facien/microweb/inmuno/LIBROTEMA1.htm
6. Iañez P. Curso de inmunología, el sistema del complemento. Universidad de Granada. España. Disponible en www.urg.es/~eianez/inmuno
7. Nahmad V. *et al.* Función inmunológica y aprendizaje: papel de la frustración y de la euforia. Argentina. 1998. Disponible en www.rec.Uba.ar/pc_98_00/htm.
8. Monco I. Inmunología básica. España. Disponible en www.es/inmuno.htm
9. Kroes BH., Nimba Arishta. Impact of the Preparation Process on Chemical Parameters and Immunomodulatory Activity. Utrecht: Editorial Elinkwijk B.v., 1990 159p.
10. Rose N., Friedman H. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd edición. Estados Unidos de América. American Society for Microbiology, 1986. 129p.
11. Roit IM. Essential Immunology. London: Editorial Blackwell Scientific Pub., 1977. 324p.
12. Hadden J. Szentivcinyi. Immunopharmacology. Vol. 1. Estados Unidos de América: Editorial Plenum Press., 1990. 418p.
13. Bertman G. Katzun G. Farmacología Básica y Clínica. 2^a edición. México: Editorial Manual Moderno S.A. de Cv. 1986.
14. Roit I, Brostoff J, Male D. Immunology. Estados Unidos de América: Editorial Churchill Livingstone, 1985. 11p.
15. Dean J., Luster H., Munson A. Immuno-modulatory, Immunotoxicology and Immuno-pharmacology. Raven Press, New York, 1985.
16. Cañigual S. y Vila R. Fitoterapia: conceptos y límites, fuente de información. España. Disponible en www.fitoterapia.net
17. Abraham A. Fitoterapia. Argentina. Disponible en www.belgranocit.com
18. Martín U. Manual didáctico de fitoterapia. España. Disponible en www.personal.redestb.es/Martin/pfito.htm
19. Portal argentino sobre homeopatía unicista y terapias alternativas. Fitoterapia. Argentina. Disponible en www.aurasalud.com
20. Alonso JR. Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas. Argentina: Isis Ediciones SSRL. 1998. 967p.
21. Cáceres A. Plantas de uso medicinal de Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria 1996. 402p (pp. 5-162)
22. Phillipson David y Colin Wrieth. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agent. *J. Ethnopharmacol.* 1991;32:155-165.
23. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for treatment of protozoal Infection. I Screening of activity to bacteria, fungi and trypanosomes American 13 native plants *J. Ethnopharmacol.* 1998;62:195-202.
24. Colegate S, Molyneux R. Bioactive Natural Products. Boca Raton: CRC Press, 1993. 317p.
25. Simons JM. *et al.* Immunomodulatory compounds from *Pichorhiza kurroa* isolation and characterization of two anti-complementary polymeric fraction from an aqueous root extract. *J. Ethnopharmacol.* 1989; 26:169-182.
26. Klerx, Beukelman, Van Dijk y Willers. Microscopy for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *J. Immunol. Meth.* 1983; 63:215-220.