

## Tesis de Posgrado

# Efectos inmunomoduladores de extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L.

Courrèges, María Cecilia

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Courrèges, María Cecilia. (1994). Efectos inmunomoduladores de extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2671\\_Courreges.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2671_Courreges.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Courrèges, María Cecilia. "Efectos inmunomoduladores de extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2671\\_Courreges.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2671_Courreges.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**EFECTOS INMUNOMODULADORES DE  
EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE  
MELIA AZEDARACH L.**

Autor: Licenciada María Cecilia Courrèges

Directora: Doctora Celia Esther Coto

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Virología  
Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar  
al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1994

*Tesis  
2671  
Ej. 2*

*A mi familia*

*A Fabián*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia Esther Coto por haberme brindado la oportunidad de dar los primeros pasos en la investigación científica y por la confianza depositada en mí durante la realización del presente trabajo de tesis.

A Fabián por su presencia, apoyo y estímulo cotidiano, por todos los momentos compartidos y por su valiosa amistad.

A los restantes integrantes del Laboratorio de Virología: Adriana, Andrea, Ariel, Bessie, Carlos Lemos, Carlos Pujol, Constanza, Elsa, Félix, Graciela, Hernán, Isabel, Josefina, Juan, Laura Alché, Laura Maskin, Laura Raiger, Luis, Mariana, Mónica Córdoba, Mónica Wachsman, Nancy, Nelly, Sebastián, Silvia, Soledad, Susana, Teresa y Viviana por su afecto y colaboración.

Al Dr. Ernesto Massouh, a Guillermo y al resto de los integrantes del Laboratorio del Inmunoquímica por el apoyo recibido.

A los restantes miembros del Area de Microbiología y en particular a Sandra, Adriana, Marina, Gustavo y Alejandro por todos los gratos momentos compartidos entre café y café.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (INTA Castelar) y en particular al Dr. Alejandro Schudel y a la Dra. Ana

María Sadir, por haberme facilitado los animales con los que se desarrollaron los experimentos.

A la Sección de Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires y en particular a la Dra. Isabel Piazzón, a la Dra. Irene Nepomnaschy y al Señor Juan, por su valiosa colaboración y estímulo en el desarrollo de los experimentos relacionados con el estudio de la inmunidad celular.

A la Bioq. Ana María Celentano por su colaboración en los experimentos de quimioluminiscencia.

A todos los que de una u otra manera contribuyeron a la realización del presente trabajo de tesis.

## ABREVIATURAS

CFA: células formadoras de anticuerpos  
Con A: concanavalina A  
conc.: concentración  
CPA: Células Peritoneales Adherentes  
cpm: cuentas por minuto  
D: Dalton  
DI50%: dosis inhibitoria 50%  
ev.: endovenosa  
fg.: fentogramo  
g.: gramo  
GRC: glóbulos rojos de carnero  
h.: hora/s  
IFN: interferón  
ip.: intraperitoneal  
kD: kilodalton  
kg.: kilogramo  
LPS: lipopolisacárido  
MEM: Medio Esencial Mínimo de Eagle  
mg.: miligramo  
mg./ml.: miligramo/mililitro  
µg.: microgramo  
µM: micromolar  
min.: minuto/s  
ml.: mililitro  
M: Molar  
NET: nitroazul de tetrazolio  
ng.: nanogramo  
N.S.: no significativo  
PHA: fitohemaglutinina  
PBS: Buffer Salino fosfatado  
pi.: postinoculación  
pg.: picogramo  
PMA: forbol (5-amino-2,3 dihidro-1,4-phthazinediona)  
PMN: polimorfonucleares  
%V/V: porcentaje volumen en volumen  
%P/V: porcentaje peso en volumen  
sc.: subcutáneo  
DS: desvío standard  
UFP: unidad formadora de placas  
UHA: unidades hemaglutinantes  
vs.: versus

## INDICE

### INTRODUCCION

1.- GENERALIDADES SOBRE EL SISTEMA INMUNE.....	1
2.- INMUNOMODULADORES.....	4
3.- ESTRATEGIAS PARA LA BUSQUEDA DE NUEVOS INMUNOMODULADORES.....	5
4.- INMUNOMODULADORES DE ORIGEN VEGETAL.....	8
4.1.- Compuestos de bajo peso molecular.....	9
4.1.1.- Alcaloides.....	9
4.1.2.- Terpenoides.....	11
4.1.3.- Fenoles, quinonas y lípidos.....	13
4.2.- Compuestos de alto peso molecular.....	19
4.2.1.- Polisacáridos.....	19
4.2.2.- Lectinas.....	23
4.2.3.- Péptidos y proteínas.....	24
5.- LAS MELIACEAS Y EL SISTEMA INMUNE.....	25
6.- MELIA AZEDARACH L.....	28
6.1.- Características generales de la planta.....	28
6.2.- Propiedades biológicas del árbol.....	29
6.3.- Estudios sobre el mecanismo de acción del principio activo antiviral.....	31
6.4.- Efectos de extractos acuosos de hojas de <i>Melia</i> <i>azedarach</i> L. sobre la multiplicación viral "in vivo".....	34

OBJETIVOS.....	37
----------------	----

## MATERIALES Y METODOS

1.- ANIMALES.....	38
2.- CELULAS.....	38
2.1.- Líneas celulares.....	38
2.2.- Células peritoneales adherentes (CPA) de ratón.....	39
2.2.1.- Macrófagos residentes y no residentes....	39
2.2.2.- Polimorfonucleares (PMN).....	40
2.3.- Células de bazo y ganglios de ratón.....	41
3.- VIRUS.....	43
3.1.- Preparación de stock viral.....	43
3.2.- Titulación viral por el método de unidades formadoras de placas (UFP).....	43
4.- MATERIAL VEGETAL.....	44
4.1.- Recolección del material vegetal.....	44
4.2.- Preparación de los extractos.....	45
4.2.- Determinación de la actividad antiviral de los extractos.....	45
5.- DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO.....	46
6.- DETERMINACION DEL EFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA.....	46
6.1.- Opsonización de glóbulos rojos de carnero (GRC).....	47
6.2.- Ensayo de opsonoeritrofagocitosis.....	47



6.3.- Reversibilidad del efecto del extracto sobre la capacidad fagocítica.....	48
6.4.- Cinética de establecimiento del efecto del extracto sobre la capacidad fagocítica de macrófagos murinos.....	49
7.- DETERMINACION DEL EFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LA PRODUCCION DE RADICALES LIBRES.....	49
7.1.- Opsonización de zimosán.....	50
7.2 - Ensayo de quimioluminiscencia.....	50
7.3.- Ensayo de reducción de Nitroazul de tetrazolio (NBT).....	51
8.- DETERMINACION DEL EFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LOS CELULAS LINFOIDES.....	53
8.1.- Ensayo de incorporación de ( <sup>3</sup> H)Timidina.....	53
8.2.- Efecto del extracto sobre la producción de interferón (IFN).....	54
8.2.1.- Inducción de IFN.....	54
8.2.2.- Titulación de IFN <i>gamma</i> .....	54
9.- DETERMINACION DEL EFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	55
9.1.- Dosaje de anticuerpos hemaglutinantes.....	56
9.1.1.- Inducción de anticuerpos hemaglutinantes en ratón.....	56
9.1.2.- Titulación de anticuerpos hemaglutinantes séricos de ratón.....	57
9.2.- Ensayo de titulación de células formadoras de anticuerpos (CFA).....	58
9.2.1.- Obtención de células linfoideas para la	

técnica de CFA.....	58
9.2.2.- Preparación de la cámara de Cunningham...	58
9.2.3.- Detección de CFA.....	59
10.- DETERMINACION DEL EFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR.....	60
10.1.- Reacción de injerto contra huésped.....	60
10.2.- Reacción de hipersensibilidad retardada.....	62
11.- ANALISIS ESTADISTICO.....	63

## RESULTADOS

### PARTE I: EFECTO DEL TRATAMIENTO IN VITRO CON EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* L. SOBRE EL SISTEMA INMUNE DEL RATON

1.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales murinos.....	64
1.1.- Toxicidad de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia azedarach</i> para los macrófagos peritoneales murinos.....	65
1.2.- Reversibilidad del efecto de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre la fagocitosis de los macrófagos peritoneales murinos.....	67
1.3.- Cinética de establecimiento del efecto de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia azedarach</i>	

sobre la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales murinos.....	69
1.4.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia     azedarach</i> sobre el metabolismo oxidativo de macrófagos peritoneales murinos.....	71
2.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia     azedarach</i> sobre la capacidad fagocítica y el metabolismo oxidativo de PMN.....	73
3.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia     azedarach</i> sobre la capacidad proliferativa de linfocitos murinos.....	76
3.1.- Toxicidad de los extractos extractos acuosos de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre los linfocitos murinos.....	80
3.2.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de <i>Melia     azedarach</i> sobre la producción de IFN gamma.....	83

PARTE II: EFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO CON EXTRACTOS  
ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* L. SOBRE EL  
SISTEMA INMUNE DEL RATON

1.- Capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales provenientes de animales tratados con extractos acuosos de hojas de <i>Melia azedarach</i> .....	85
2.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre la respuesta inmune humoral.....	86
2.1.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso	

de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre la producción de anticuerpos hemaglutinantes.....	87
2.2.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre el número de CFA.....	89
3.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre la respuesta inmune celular.....	91
3.1.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por GRC.....	92
3.2.- Efecto del tratamiento con los extractos acuosos de hojas de <i>Melia azedarach</i> sobre la reacción de injerto contra huésped.....	94
DISCUSION.....	98
BIBLIOGRAFIA.....	109

# **INTRODUCCION**

## 1.- GENERALIDADES SOBRE EL SISTEMA INMUNE

A lo largo de la evolución los vertebrados han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten mantener su integridad y salud frente a las agresiones de elementos extraños (no propios) de naturaleza física y química diversa presentes en el medio ambiente. El conjunto de mecanismos de defensa capaces de producir moléculas o células que, específicamente combaten a los elementos invasores, llamados genéricamente antígenos, recibe el nombre de sistema inmune.

La respuesta de un individuo a un desafío antigénico involucra una cadena de eventos en la que intervienen células y factores solubles que interactúan entre sí y terminan destruyendo al antígeno. Como esta eliminación debe ocurrir en un contexto propio, a su vez también se desarrollan mecanismos capaces de acotar o prevenir el daño a los tejidos del huésped.

Cuando el antígeno invasor es detectado por el organismo, la primera respuesta desencadenada se caracteriza por ser rápida y por carecer de especificidad. Intervienen células fagocíticas (primero neutrófilos y luego macrófagos), células "natural killer", y factores solubles como citoquinas y complemento.

El segundo nivel de defensa, a diferencia del anterior, es específico. A grandes rasgos, las células responsables de este tipo de respuesta inmune reciben el nombre de linfocitos B y T.

Cada uno de ellos es capaz de reconocer únicamente un antígeno mediante receptores dispuestos sobre su superficie (49).

Los linfocitos B son los principales mediadores de la inmunidad humoral. Estas células, luego de reconocer un antígeno, se transforman en células plasmáticas y producen factores solubles llamados anticuerpos que circulan en el suero. Dichos anticuerpos reconocen al antígeno, libre o asociado a células, y permiten así la acción de otras células o del complemento, que por diversos mecanismos, lo destruyen. Los componentes del complemento y las citoquinas, son necesarias para una respuesta humoral apropiada.

Los linfocitos T pueden desempeñar un gran número de funciones diferentes, pero básicamente se los puede clasificar en reguladores y efectores. Dentro de los primeros podemos encontrar algunos linfocitos con función "helper" que colaboran con la inducción de una respuesta inmune y otros linfocitos con actividad supresora que regulan en forma negativa, es decir, inhiben la mencionada respuesta. Las células reguladoras ejercen su efecto, en mayor o menor medida, sobre todos los componentes del sistema inmune (49, 51).

Los macrófagos procesan los antígenos y los presentan sobre su superficie en asociación con moléculas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Los linfocitos T "helper" reconocen el antígeno así presentado, proliferan y estimulan directamente o mediante la secreción de citoquinas a otras células linfoides a diferenciarse en células

efectoras. Por el contrario, los linfocitos supresores reconocen al antígeno de forma directa o asociado con moléculas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y actúan inhibiendo la respuesta.

Entre los linfocitos T efectores podemos distinguir a aquellos que se asocian con respuestas de hipersensibilidad retardada y aquellos que actúan como mediadores de respuestas citotóxicas. Este tipo de respuestas están involucradas en las reacciones de rechazo de injertos, alergias, resistencia a tumores y de defensa contra parásitos, hongos, virus y unas pocas bacterias.

Las células T de hipersensibilidad retardada son células que han sido sensibilizadas por exposición a un antígeno en contexto de histocompatibilidad de clase II. Al tomar contacto por segunda vez con el mismo antígeno, dichas células reaccionan proliferando y liberando citoquinas que atraen otros tipos celulares al lugar de desafío, en el que se produce la reacción de tipo inflamatorio entre 24 y 72 hs más tarde (87).

Las células T citotóxicas reconocen los antígenos sobre la superficie celular en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y las destruyen. Estas células juegan un papel muy importante en el control de las infecciones virales y en el rechazo de injertos (87).

Además de las ya mencionadas existen otras células inmunocompetentes. Entre ellas podemos mencionar a las "natural



killer" y las "killer". Son no fagocíticas y se las clasifica como pertenecientes al linaje linfoide. Las células recién mencionadas son importantes en las respuestas inmunes contra tumores.

## 2.- INMUNOMODULADORES

Un agente inmunomodulador puede ser definido como una sustancia de origen natural o sintético que puede alterar directa o indirectamente una función inmune específica.

La naturaleza química de las sustancias inmunomoduladoras es variada. Si bien, la mayor parte de ellas son péptidos y polisacáridos, actividades modificadoras de la respuesta inmune pueden atribuirse, entre otros, a glicoproteínas, nucleótidos, alcaloides, terpenoides, quinonas y compuestos fenólicos simples.

Una clasificación tentativa de este tipo de sustancias, las divide en dos grandes grupos: agentes inmunoestimuladores (estimulan ciertas funciones del sistema inmune) y agentes inmunosupresores (ejercen un efecto inhibitorio sobre ciertas funciones del sistema inmune). Sin embargo, esta división no es rígida y en muchos casos una misma sustancia puede tener efectos muy diversos, lo cual no es sorprendente teniendo en cuenta la complejidad de la respuesta inmune y de sus mecanismos de regulación. Dependiendo de las condiciones

experimentales (dosis administrada, vía de inoculación, esquema de tratamiento, vehículo, edad del huésped) y de la función bajo estudio, la misma sustancia puede ejercer un efecto estimulador o uno inhibidor.

Se realizan muchos esfuerzos para modular los mecanismos naturales de defensa de un huésped y restaurar las funciones alteradas del sistema inmune asociadas con diversas enfermedades. Los inmunomoduladores constituyen, en muchos casos, una alternativa a quimioterapias convencionales para el tratamiento de: infecciones crónicas o persistentes de origen viral o bacteriano y sus secuelas; inmunodeficiencias primarias y secundarias; enfermedades oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. También pueden aplicarse clínicamente a pacientes con cáncer ya que el crecimiento de los tumores puede ser inhibido estimulando componentes específicos del sistema inmune tales como células fagocíticas y "natural killer". Las enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoidea, la poliartritis, la hepatitis crónica activa, la miastemia gravis, la esclerosis múltiple y la psoriasis, pueden encontrar una solución en este tipo de compuestos.

### 3.- ESTRATEGIAS PARA LA BUSQUEDA DE NUEVOS INMUNOMODULADORES

Si bien se conoce un enorme número de compuestos capaces de modificar la respuesta inmune, sólo unos pocos resultan

verdaderamente efectivos cuando se los utiliza con fines terapéuticos.

La búsqueda de nuevos productos inmunomoduladores involucra un equipo coordinado de expertos en microbiología, medicina, química de péptidos y proteínas, biología molecular, inmunología y otras áreas de biología celular, biotecnología, farmacología y procesamiento de datos. Este equipo tiene como objetivo identificar inmunomoduladores más selectivos, más efectivos y mejor tolerados. Distintas aproximaciones se emplean para lograr el objetivo anteriormente mencionado (90). Una de ellas, la empírica, implica un relevamiento de gran cantidad de compuestos con el fin de encontrar alguna sustancia activa siendo buenas fuentes sobrenadantes de cultivos de microorganismos o extractos vegetales. Este trabajo suele ser tedioso pero resulta sencillo hoy en día, teniendo en cuenta que existen grandes posibilidades de automatización y sofisticados sistemas de procesamiento de datos.

El éxito de la modalidad de búsqueda anteriormente descrita depende del diseño de los sistemas de prueba de las actividades buscadas. En general, la capacidad inmunomoduladora de un compuesto se evalúa con una batería de ensayos. Un grupo importante de pruebas trata de determinar "in vitro" el efecto del compuesto sobre el sistema inmune celular y humoral, analizando para ello el estado funcional de granulocitos, macrófagos, poblaciones de linfocitos T y B, células "natural killer" y complemento.

Una vez que se ha aislado una actividad inmunomoduladora, se purifica y se realiza un análisis estructural del compuesto responsable, se sintetizan derivados químicos y se evalúan sus propiedades biológicas. La modificación química tiene dos metas fundamentales que son mejorar la eficacia de la droga y reducir sus posibles efectos colaterales.

Por otro lado, existe una aproximación más racional para la búsqueda de inmunomoduladores que se basa en analizar el efecto de drogas químicamente definidas que puedan potencialmente interferir en los eventos bioquímicos que están involucrados en la activación y replicación de las células del sistema inmune.

Los datos bibliográficos indican que entre el 95 y 99 % de los compuestos ensayados no modifican la respuesta inmune y en los casos en que se ha encontrado un resultado positivo, todavía queda un largo camino por recorrer ya que muchos de los productos activos "in vitro" no lo son "in vivo" o tienen efectos colaterales severos y no deseables.

Cuando los experimentos "in vitro" revelan alguna estructura promisoría, esta debe ser evaluada en modelos de inmunomodulación "in vivo" como la reacción de injerto contra huésped, la producción de anticuerpos y la respuesta de hipersensibilidad retardada. Si el compuesto resulta efectivo en alguno de estos modelos en ausencia de toxicidad para los huéspedes, se continúan los estudios "in vivo" analizando la eficacia de la droga en reacciones de trasplantes de distintos

órganos y en modelos de autoinmunidad. Solamente cuando los resultados obtenidos en las pruebas anteriores son satisfactorios, se evalúa la posibilidad de realizar ensayos clínicos en pacientes.

#### 4.- INMUNOMODULADORES DE ORIGEN VEGETAL

Las plantas constituyen una fuente de compuestos potencialmente activos sobre el sistema inmune. Preparaciones crudas obtenidas a partir de algas o de distintos órganos de plantas vasculares con propiedades medicinales han resultado el punto de partida para la obtención de moléculas capaces de modificar la respuesta inmune ya sea estimulándola o deprimiéndola.

Dado que los compuestos inmunomoduladores de origen vegetal, son de naturaleza química muy variada (hecho que no resulta extraño teniendo en cuenta el enorme número y la diversidad de especies vegetales existentes), los dividiremos tentativamente en compuestos de bajo o de alto peso molecular. Entre los primeros podemos incluir alcaloides, isobutilamidas, ésteres de ácidos fenol carboxílicos y terpenoides, mientras que entre los segundos los más importantes resultan las proteínas y los polisacáridos.

#### 4.1.- Compuestos de bajo peso molecular

##### 4.1.1.- Alcaloides

El primer compuesto nitrogenado de origen vegetal que se identificó como inmunoestimulador fue el ácido aristolóquico, un alcaloide aislado de *Aristolochia clematitis*. El efecto curativo de extractos de esta planta, utilizados desde la antigüedad para el tratamiento de mordeduras de víboras y heridas infectadas, pudo explicarse como consecuencia de la estimulación del sistema inmune del huésped tratado. Diversos experimentos demostraron que la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales y polimorfonucleares murinos se vio aumentada luego de una incubación "in vitro" con el extracto. Por otro lado, en 1977, Bartfeld y col. establecieron que cuando el ácido aristolóquico era administrado por vía oral durante varios días consecutivos, se producía un incremento de la fagocitosis y de la producción de interleuquinas por parte de los macrófagos (15).

Desde entonces, se han identificado numerosos alcaloides activos sobre el sistema inmune. La mayoría de ellos estimula la actividad de las células fagocíticas.

Entre otros, cefarantina, aislada de *Stephania cepharantha*, es capaz de estimular la producción de anticuerpos y de inhibir la secreción de aminas vasoactivas como la histamina y la serotonina por parte de mastocitos en

experimentos "in vivo". Dependiendo de la dosis y la vía de administración, este compuesto presenta efectos inmunoestimuladores o efectos inmunosupresores antialérgicos (103).

La isopteropodina aislada de la planta peruana *Uncaria tomentosa* (uña de gato), es capaz de estimular "in vitro" la fagocitosis de leucocitos polimorfonucleares a bajas concentraciones ( $10^{-3}$  -  $10^{-6}$  mg./ml.) (102). Por el contrario, isómeros de este compuesto y otros alcaloides relacionados no son activos, demostrando una estrecha relación estructura-función.

Es importante señalar que la mayoría de los alcaloides aislados a partir de plantas exhiben actividad inmunosupresora a altas concentraciones e inmunoestimuladora cuando las concentraciones empleadas son muy bajas. A modo de ejemplo podemos mencionar a la emetina, la berberina y la gelsemina, que incrementan la actividad fagocítica a concentraciones de  $10^{-4}$  mg./ml. pero a mayor concentración el mencionado efecto se revierte (104 y 110).

La vincristina, un alcaloide citostático utilizado para el tratamiento de leucemia induce un incremento en la producción de anticuerpos contra un antígeno específico en animales tratados con dosis de 30  $\mu$ g./100g. de peso del huésped. A dosis mayores, la vincristina produce una reducción de la formación de anticuerpos.

Los extractos acuosos de hojas de *Tylophora indica* y *Tylophora asthmatica* eran utilizados en medicina natural para el tratamiento del asma bronquial (73) y el reumatismo (33). Teniendo en cuenta estos datos, se iniciaron una serie de estudios que revelaron que los extractos ejercían efectos antianafilácticos, inducían leucopenia (54) y suprimían significativamente las respuestas inflamatorias agudas o crónicas en modelos animales (50). Finalmente pudo establecerse que las actividades anteriores eran consecuencia de un efecto directo de los extractos sobre la liberación de histamina. La tiloforina, químicamente relacionada con el ácido aristolóquico, fue identificado como principio activo responsable de las actividades presentes en el extracto.

#### 4.1.2.- Terpenoides

Muchos terpenoides presentan actividad antiartrítica y antiinflamatoria. Esto es particularmente aplicable a las sesquiterpenolactonas, cuya actividad biológica es una consecuencia directa de su efecto sobre el sistema inmune (53). Luego de estudiar en experimentos "in vivo" la actividad de distintas sesquiterpenolactonas, la máxima actividad antiartrítica (50 - 70% de inhibición de un edema) se observó cuando se emplearon helenalina, tenulina y eupahisopina a concentraciones de 2,5 mg./kg.. El efecto de estos compuestos



parece darse en dos fases: primero se incrementa la producción de anticuerpos y luego se inhibe la proliferación de linfocitos T.

La presencia de helenanina, dihidrohelenanina y ésteres derivados, compuestos capaces de reprimir la respuesta inmune celular afectando a linfocitos T, macrófagos y granulocitos (112), en extractos de hojas de plantas como *Crysanthemum parthenium* y especies de la familia Arnica de las cuales se obtenían estos compuestos explicaría las propiedades antiinflamatorias atribuidas a dichos extractos (68).

Por el contrario, la actividad antitumoral de varios de estos compuestos parece ser el resultado de la alquilación directa de enzimas celulares y no de un efecto estimulatorio sobre células "natural killer" (101).

En este contexto, es interesante señalar que el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) puede transformar macrófagos peritoneales de ratón en células citotóxicas a concentraciones de  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$  M, independientemente de la presencia de linfocitos (52). La activación está acompañada por la liberación de peróxido de hidrógeno y de prostaglandinas. Por otro lado, Abb y col. (1) demostraron que el mismo éster actúa como mitógeno y estimula la síntesis de ADN en linfocitos de primates. Es posible que las células estimuladas sean supresoras, ya que Goldfarb y Herberman (47) observaron que los ésteres de forbol son capaces de inhibir la actividad de células "natural killer" de ratón y humanas.

Las briostatinas recientemente aisladas a partir del alga *Budula nerítica* mostraron un efecto dependiente de la dosis (80). La briostatina I muestra una capacidad máxima de estimulación de granulocitos y linfocitos en un rango de concentraciones que oscila entre los 100 pg. y los 10 fg./ml., respectivamente. Estos datos son coincidentes con los de May y colaboradores (71), quienes encontraron que las briostatinas, además de su actividad antineoplásica conocida eran capaces de ejercer un efecto estimulador multipotencial sobre todos los tejidos hematopoyéticos.

Un esteroide glicosilado aislado de las raíces de *Cynanchum caudatum* es capaz de incrementar la fagocitosis de macrófagos y la inmunidad celular en el ratón (103).

En general, las saponinas se describen como adjuvantes. Sin embargo, Lutomski y col. (103) reportaron que una mezcla químicamente no definida de saponinas de *Aralia mundshurica* fue capaz de incrementar la fagocitosis y de inhibir el desarrollo de ciertos tumores como consecuencia de una estimulación del sistema inmune.

#### 4.1.3.- Fenoles, quinonas y lípidos

Entre los compuestos aromáticos o fenólicos de origen vegetal, podemos mencionar al lignano cleistantina derivado de *Cleistanthus collinus* que es capaz de aumentar el número de

granulocitos cuando una dosis de 0,75 mg./kg. es administrada oralmente a ratas, gatos y monos (29).

Se ha reportado que el ácido 2,3-dihidroxibenzoico estimula la actividad fagocítica de polimorfonucleares por un mecanismo de acción similar al de la vitamina E, es decir que la estimulación observada se debe a la protección de las membranas celulares contra el mecanismo autooxidativo de destrucción a cargo del peróxido de hidrógeno (29).

Por otro lado, Xu y col. (119) han establecido que el ácido ferúlico, presente en numerosos extractos vegetales, es capaz de incrementar la fagocitosis de células de ratón mientras que el anetol, obtenido del aceite de semillas de anís incrementa el número de leucocitos (59). Numerosas catequinas y procatequinas ácidas (104) son capaces de producir una estimulación de granulocitos y un incremento del "clearance" de carbón.

Ciertos análogos del ácido araquidónico como el alquilcatecol urushiol en baja concentración, presentes en preparaciones obtenidas de hojas de plantas de *Toxicodendron radicans*, son utilizados para el tratamiento homeopático de enfermedades de la piel. En estas condiciones, el compuesto es capaz de inducir "in vitro" la blastogénesis de linfocitos e "in vivo" alergias de contacto (31). El efecto farmacológico de esta droga se debe a una estimulación no específica del sistema inmune. Por el contrario, el mismo urushiol y algunos diarilheptanoides obtenidos de la familia Zingiberaceae tales

como el gingerol (60 y 61) inhiben tanto la ciclooxigenasa como la 5-lipooxigenasa cuando se los aplica en altas concentraciones.

Los cardanoles y cardoles de *Anacardium occidentale* y *Schinus therebinthifolius* muestran actividades variables dependiendo de la longitud y del grado de saturación de la cadena lateral (112).

También se ha reportado la actividad inductora de interferón del gosipol, un naftaleno aislado de aceite de semillas de algodón (103).

Otro grupo de compuestos con actividad estimuladora del sistema inmune está constituido por las ubiquinonas que están estructuralmente relacionadas con el urushiol. Según Block y col. (24), las ubiquinonas Q<sub>7</sub> y Q<sub>8</sub> son capaces de incrementar significativamente la fagocitosis de macrófagos en concentraciones de 100 µg./ml. El test de "clearance" de carbón revela que la velocidad de "clearance" se incrementa al doble cuando los animales reciben una dosis de 30 mg./kg.. En animales tratados con ciclofosfamida, la ubiquinona Q<sub>7</sub> induce la secreción del factor estimulador de colonias e incrementa el número de granulocitos periféricos (103). La sobrevida de ratones granulocitopénicos infectados experimentalmente con *Klebsiella pneumoniae* y con *Staphilococcus aureus* aumenta significativamente (104).

Por el contrario, la plumbagina, naftoquinona obtenida de *Plumbago zeylanicum* ejerce un efecto inmunosupresor o

citotóxico contra cultivos primarios de granulocitos en un rango de concentración de 100 µg. a 100 ng./ml., mientras que estimula a los mismos granulocitos cuando es aplicada en un rango de concentración menor, de 100 pg. a fg./ml. (110 y 104). Resultados idénticos sobre granulocitos y linfocitos T humanos se observan con otras naftoquinonas aisladas de fuentes vegetales como la chimafilina, la alcanina, la shikonina, la colchicina y la suramina (110).

Entre los lípidos que pueden modular la respuesta inmune, la lisolecitina y algunos análogos sintéticos, los alquil-lisofosfolípidos merecen una mención especial. Modolell y col. (72) establecieron que la actividad citotóxica de macrófagos peritoneales normales y la actividad tumoricida de macrófagos de médula ósea se ve incrementada por la acción de dichos compuestos.

Dentro del grupo de compuestos de bajo peso molecular obtenidos a partir de extractos vegetales, existen muchos con propiedades antiinflamatorias. Estos compuestos bloquean el metabolismo del ácido araquidónico inhibiendo simultáneamente a la ciclooxigenasa y la 5-lipoxigenasa, lo cual es sorprendente porque ambas enzimas poseen distintos sitios activos.

Luego del descubrimiento del ácido acetil salicílico, muchos derivados han sido sintetizados pero ninguno de ellos ha resultado más activo que el compuesto original. Todos los compuestos de este grupo tienen un efecto débil sobre la ciclooxigenasa.

Los derivados de alcohol salicílico obtenidos de corteza de sauce son inactivos cuando la concentración es inferior a 250  $\mu\text{M}$ , pero resultan efectivos antiinflamatorios "in vivo" luego de ser oxidados a ácido salicílico en el hígado (41). A partir de distintas especies de *Primula* se ha aislado un compuesto el 4-metoxi-ácido salicílico-metil éster que resulta más activo que la aspirina (107).

Los aceites esenciales obtenidos a partir de distintas plantas, entre las cuales podemos mencionar *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris* o *Ledum palustre*, contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos como el eugenol. Estos compuestos presentan propiedades antiinflamatorias, desplegando efectos inhibitorios similares a los de la indometacina. Se ha podido verificar que los efectos antirreumáticos de estos compuestos resultan de su acción sobre la ciclooxigenasa.

En el grupo de los flavonoides y catequinas muchos compuestos, como la galangina resultan buenos inhibidores de la ciclooxigenasa (115). Estos compuestos son efectivos cuando se los aplica como tópicos. En cambio, cuando se los administra por vía sistémica es muy difícil conseguir niveles adecuados en sangre ya que se metabolizan muy rápidamente. Esto mismo es cierto para los taninos. El más efectivo inhibidor de la ciclooxigenasa de este tipo es el galotanino mezcla de tetra, penta y oligogalailglucosa (112). En oposición a todo el resto de los compuestos fenólicos, la actividad de los galotaninos se debe a su capacidad de secuestrar radicales oxigenados.

Numerosos flavonoides y cumarinas con estructura de catecol como la wedelactona aislada de *Eclipta alba* y otros derivados de cumestrol resultaron activos inhibidores de la 5-lipooxigenasa (118).

Es interesante señalar que ciertas amidas alifáticas como el spilantol de *Spilanthus oleracea*, el ácido dodecatetranoico-isobutilamida de *Echinacea purpurea* y el principio acre de la capsaína de *Capsicum annuum* han resultado inhibidores eficientes de la 5-lipoxigenasa (112 y 113).

Los poliacetilenos son también buenos inhibidores de la ciclooxigenasa. Los hidrocarburos puros son menos activos que las poliinas que contienen grupos OH. Por ejemplo, la poliina, safrol-2-o-isobutirato es un inhibidor de la ciclooxigenasa. Los poliacetilen glicósidos no presentan la actividad. Las poliinas alquilamidas que contienen nitrógeno son menos activas, lo cual sugiere que los efectos antiinflamatorios de los extractos lipofílicos de *Bupleurum*, *Bidens* y *Echinaceae* que contienen poliacetilenos pueden deberse parcialmente a la presencia de estos compuestos (16).

El sistema complemento juega un papel fundamental en los sistemas de defensa del organismo contra procesos inflamatorios. Existen compuestos de origen vegetal de bajo peso molecular capaces de inhibir la cascada del complemento.

Entre los compuestos de bajo peso molecular, el ácido boswélico obtenido a partir de *Boswellia serrata*, la glicirrizina, algunos ácidos fenolcarboxílicos como el ácido

rosmarínico y acilflavonolglucósidos han resultado ser buenos inhibidores de la cascada clásica del complemento (112 y 105).

Es notable señalar que el ácido boswélico es a la vez, un buen inhibidor de la 5-lipooxigenasa (2).

#### 4.2.- Compuestos de alto peso molecular

##### 4.2.1.- Polisacáridos

En los últimos veinte años un gran número de polisacáridos con actividad inmunoestimuladora han sido aislados de plantas superiores.

Las actividades inmunoestimuladoras de los polisacáridos se manifiestan de distintas maneras. A este tipo de compuestos se le atribuyen actividad estimuladora de fagocitosis de granulocitos y macrófagos, inducción de interferón, interleuquinas y factor de necrosis tumoral y activación de complemento.

La gran variedad de polisacáridos conocidos no actúa sobre los mismos componentes del sistema inmune, por lo que resulta muy difícil establecer una relación estrecha entre las características estructurales básicas de los compuestos y la actividad inmunoestimulante.

Los polisacáridos activos sobre los macrófagos son predominantemente xiloglucanos neutros, arabinogalactanos con



ácido glucurónico o 4-O-metil-glucuronoxilanos. En general, estos polímeros son altamente ramificados con unidades estructurales aniónicas y pesos moleculares que oscilan en el rango de 20.000 a 50.000 D ó más. Ellos derivan de paredes primarias de las células y tienen propiedades pécticas o propécticas. Algunos son viscosos, perteneciendo a la clase de gomas y mucílagos (44).

Entre los compuestos que son capaces de activar al complemento se encuentran polisacáridos ácidos con estructura de poligalacturonanos y cadenas laterales de arabinogalactanos (120).

Se asume que la estructura terciaria de estos polisacáridos está en estrecha relación con su modo de acción.

Las raíces de *Echinacea purpurea* o de *Echinacea angustifolia* han sido utilizadas por los aborígenes norteamericanos para el tratamiento de infecciones. Hoy en día extractos de ambas plantas se conocen por sus propiedades inmunomoduladores y se utilizan terapéuticamente y profilácticamente para el tratamiento de infecciones y de bronquitis crónica, sinusitis e influenza (106 y 86).

Polisacáridos químicamente definidos con propiedades inmunestimuladoras han sido aislados a partir de *Echinacea purpurea* (69 y 86). Entre ellos podemos mencionar: un heteroxilano (peso molecular 35.000 D), un arabinoramnogalactano ácido (peso molecular 450.000 D) y un fucogalactosilglucano (peso molecular 25.000 D). Todos ellos

estimulan la fagocitosis de macrófagos y granulocitos y la producción de monoquinas, como interleuquina-1 y factor estimulador de linfocitos. Otros polisacáridos aislados y purificados a partir de la misma planta presentan actividades similares. Uno de ellos es un arabinogalactano (peso molecular 75.000 D) (111) que incrementa la citotoxicidad de macrófagos contra células tumorales y contra microorganismos tales como *Leishmania enrietti*, *Candida albicans*. Mas aún, este polisacárido induce "in vitro" a los macrófagos a producir factor de necrosis tumoral, interleuquina-1, interferón beta y radicales libres que luego se pueden medir por quimioluminiscencia. El arabinogalactano no activa a los linfocitos B y no induce a los T a producir interleuquina-2, interferón beta o gamma, pero estimula su proliferación. La gran ventaja de estos polisacáridos es que parecen actuar bastante selectivamente sobre los macrófagos y que no son tóxicos en un amplio rango de dosis. La respuesta inmune específica de hipersensibilidad retardada a eritrocitos de carnero o a listeria no se ve afectada por estos polisacáridos (69), confirmando los resultados obtenidos "in vitro".

La actividad estimuladora del arabinogalactano aislado de *Echinacea purpurea* es única, ya que compuestos de estructura similar aislados de *Viscum album* no estimulan la producción de monoquinas por parte de los macrófagos pero si activan la cascada de complemento (109).

Otros dos polisacáridos aislados de *Achyrocline satureioides* (glicanogalacturanos conteniendo ramosa, xilosa y arabinosa) muestran una interesante actividad sobre la fagocitosis de macrófagos y granulocitos, estimulan la producción del factor de necrosis tumoral y ejercen una actividad anticomplementaria fuerte tanto por la vía clásica como por la vía alterna. Dicha actividad anticomplementaria es la responsable de la disminución en la respuesta inflamatoria medida por el modelo de edema de la pata del ratón (114).

Muchos polisacáridos que contienen ácido glucurónico producen una marcada inhibición de la vía clásica del complemento. Polisacáridos obtenidos de varias plantas como *Sabal serrulata*, *Viscum album*, *Urtica dioica* y *Sedum telephium* son buenos ejemplos (120). Aquí también se observa correlación entre los efectos anticomplementarios "in vitro" y los efectos de inhibición de edema de la pata de rata (107 y 62). En general, se observa que la actividad anticomplementaria está asociada a heteroglicanos pécticos con alta proporción de galacturonanos en el esqueleto. Esta observación coincide con los reportes que indican que los polisacáridos con mayor actividad anticomplementaria aislados de algas son polisacáridos sulfatados tales como carragenano, fucoidanos y heparina. Sin embargo, hay polisacáridos neutros como la amilosa que aparecen en gran número de frutos y raíces y que son buenos agentes anticomplementarios (62).

#### 4.2.2.- Lectinas

Son una serie de proteínas o glicoproteínas que unen azúcares específicos, permitiendo de ese modo aglutinar células o precipitar glicoconjugados. Las lectinas fueron descubiertas por primera vez en vegetales y debido a su capacidad de aglutinar glóbulos rojos se las llamó fitohemaglutininas.

El peso molecular de las lectinas oscila entre 10000 y 125000 D. Contienen una o varias cadenas polipeptídicas, cada una de ellas con cientos de aminoácidos. Estos aminoácidos llevan como cadenas laterales varias docenas de residuos polisacarídicos. El principal punto de unión es el ácido aspártico. Los residuos polisacarídicos son predominantemente manosas y glucosaminas acetiladas.

Además de las propiedades hemaglutinantes ya mencionadas, las lectinas son muy importantes por su capacidad mitogénica sobre células del sistema inmune (67 y 88).

Las células blanco de la acción de estos compuestos son los linfocitos y las células "natural killer".

La linfoaglutinación ha sido observada con la fitohemaglutinina (PHA) de *Phaseolus vulgaris* y el mitógeno pokeweed aislado de la raíz de *Phytolacca americana*. La concanavalina A, aislada de *Conavalia ensiformis* y la fitohemaglutinina obtenida de *Lens culinaris* también ejercen efectos mitogénicos sobre los linfocitos (93).

La actividad citotóxica de algunas lectinas se debe en algunos casos a la inhibición de la síntesis intracelular de proteínas (89) y, en otros casos, es el resultado de la activación de células "killer".

Se sabe que las lectinas específicas para fucosa pueden saturar los receptores específicos para este azúcar en la membrana de los macrófagos y pueden inhibir la producción del factor inhibidor de la migración del macrófago (93).

Las lectinas no han sido utilizadas en inmunoterapias aunque algunas se han empleado en diagnóstico médico. Diluciones homeopáticas de extractos de *Phytolacca americana* poseen propiedades antiartríticas y citotóxicas, pero se desconoce si estos efectos se deben a la presencia de lectinas en la preparación.

Por otro lado, se ha establecido que una lectina aislada de *Viscum album* es capaz de activar las respuestas tumorocidas en animales de experimentación y en pacientes (43).

#### 4.2.3.- Péptidos y proteínas

Existen muy pocas proteínas inmunoestimulantes carentes de especificidad por un azúcar. Kojima y col (63 y 64) aislaron una proteína de raíz de *Artemisia princeps* por ultrafiltración y por cromatografía por Sephadex. Esta proteína tiene un peso molecular de 500000-1000000 y es capaz de inducir la producción

de interferón cuando se administra por vía oral o parenteral. Tal como ha sido reportado por Atherton y Burke (9), la amanitina, un ciclooctapéptido aislado de *Amanita muscaria* también induce interferón.

Otro grupo importante de proteínas de origen vegetal que tiene efecto sobre el sistema inmune es conocido con el nombre de RIPS (proteínas inactivadoras de ribosomas). Constan de dos subunidades: una que inactiva catalíticamente los ribosomas y otra que se une por afinidad a la galactosa. Estas proteínas resultan muy tóxicas para macrófagos y linfocitos. También se observa que cuando se tratan ratones con una dosis de distintas RIPS y luego se inmuniza con glóbulos rojos de carnero o con polisacáridos bacterianos, la respuesta primaria al primer antígeno disminuye significativamente mientras que la respuesta primaria al segundo no es afectada (14).

## 5.- LAS MELIACEAS Y EL SISTEMA INMUNE

Las meliaceas constituyen un grupo de plantas muy utilizado en medicina natural. Se ha reportado que extractos obtenidos a partir de hojas, corteza y semillas de distintos miembros de esta familia son utilizados exitosamente como antihelmínticos, antimicrobianos, antiinflamatorios, antirreumáticos y antitumorales y en el tratamiento de enfermedades de la piel.

En 1970, Bhargava y col. demostraron que el nimbinato de sodio, un limonoide obtenido a partir de aceite de semillas de *Azadirachta indica* (indian lilac), administrado por vía ip. u oral, era capaz de inhibir el edema inducido por carragenanos en ratas. Del mismo modo, la artritis inducida por formaldehído también era suprimida en animales tratados con este compuesto (23). Okpanyi y col. (75) obtuvieron resultados similares luego de tratar ratas por vía oral con un extracto metanólico de hojas y corteza del mismo árbol.

Pillai y Santhakumari (81) probaron el efecto de la administración oral a ratas de nimbidina, mezcla de limonoides que se obtiene del aceite de las semillas de *Azadirachta indica* (91). La fracción inhibió significativamente y de manera dependiente de la dosis, el edema inducido por carragenanos o por caolina, al igual que la artritis inducida por formaldehído.

Por otro lado, Fujiwara y col. (46) reportaron la inhibición del edema inducido por carragenanos en ratones después de la administración oral de polisacáridos obtenidos a partir de la corteza de mismo árbol.

El conjunto de experimentos previamente mencionado puso en evidencia la actividad antiinflamatoria ejercida "in vivo" por limonoides y polisacáridos obtenidos de *Azadirachta indica*.

Los limonoides fueron capaces de inhibir la respuesta inflamatoria aguda (dosada en el modelo del edema inducido por carragenano) y la crónica (dosada en el modelo de artritis

inducida por formaldehído). Esta actividad no es mediada por las glándulas adrenales ya que en los modelos de inflamación crónica el peso de estas glándulas no se incrementó (23 y 75). Teniendo en cuenta que la nimbidina es utilizada como antihistamínico (82) y que es capaz de inhibir la prostaglandina sintetasa (74), la fuerte reducción del edema en la pata de la rata pudo explicarse como una inhibición de la liberación de los mediadores de inflamación aguda mientras que la supresión de reacciones más crónicas que involucran proliferación celular se relaciona con una disminución en la respuesta inflamatoria mediada por prostaglandinas.

También se determinó que diversos polisacáridos (45) y limonoides (79) aislados de la corteza de *Azadirachta indica* poseen marcada actividad antitumoral aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo por el que actúan.

En 1987, Van der Nat y col. (94) confirmaron que las propiedades antiinflamatorias y antirreumáticas atribuidas a preparaciones crudas de *Azadirachta indica* podían explicarse como una consecuencia de la inhibición de la activación del complemento y de la producción de aniones superóxido por parte de los leucocitos polimorfonucleares (65). Ellos demostraron que extractos acuosos obtenidos a partir de la corteza de *Azadirachta indica* tenían actividad anticomplementaria "in vitro" y, al mismo tiempo, eran capaces de inhibir el metabolismo oxidativo de leucocitos de sangre humana y de estimular la producción "in vitro" del factor estimulador de



macrófagos. Resultados similares se obtuvieron con extractos acuosos de *Mumronia pumila* (66), *Cedrela tubiflora* (18) y *Trichilia glabra* (19), otros miembro de la familia Meliaceae.

La purificación de los principios activos responsables de las actividades mencionadas arrojó los siguientes resultados. La actividad anticomplementaria era ejercida por compuestos de alto peso molecular mientras que un compuesto de bajo peso molecular era el que actuaba sobre los polimorfonucleares. Finalmente, logró establecerse que dos péptidoglicanos de pesos moleculares 150 kD y 12 kD respectivamente eran los que inhibían la activación del complemento (95). Los compuestos de bajo peso molecular responsables de la inhibición de la producción de radicales libres se han identificado como ácido gálico (+)-galactocatequina, (+)-catequina, y (-)-epicatequina, compuestos presentes en muy baja proporción en los extractos acuosos de corteza de la planta (96).

## 6.- MELIA AZEDARACH L.

### 6.1.- Características generales de la planta

*Melia azedarach* L. (persian lilac), árbol vulgarmente conocido como paraíso, es una especie exótica oriunda de Asia, que ha sido cultivada con fines forestales y ornamentales en diferentes partes del mundo incluyendo la República Argentina.

Este árbol es el representante más conspicuo en nuestro país del género *Melia*, uno de los cuatro géneros incluidos en la familia *Meliaceae* y fue descrito por primera vez por Linneo en su obra *Species Plantarum* en 1753.

El paraíso es un árbol de gran porte que en la madurez puede alcanzar una altura de 10 - 15 metros. Su tronco es recto y muy rugoso y termina en una copa globosa. Posee hojas caducas, alternas, bi o tri-imparipinadas. Estas últimas están compuestas por folíolos glabros de forma aguda y bordes dentados, cuya longitud oscila entre 2 y 5 centímetros. Las flores son medianas, perfumadas, de color lila y se disponen en panojas axilares. Presentan un caliz con 5 ó 6 lóbulos imbrincados, 5 ó 6 pétalos, estigma cilíndrico de extremos dilatados, 10 ó 12 anteras, ovario con 5 celdas y estilo delgado. El fruto es una drupa elipsoidal amarilla de 1,5 - 2,5 centímetros de diámetro, que alberga semillas óseas y perdura largo tiempo en la planta. Florece en primavera conjuntamente con la aparición de las hojas (12 y 76).

## 6.2.- Propiedades biológicas del árbol

A partir de esta planta se han obtenido preparaciones con distintas propiedades biológicas que se utilizan en medicina natural y agricultura. En la mayoría de los casos el principio activo responsable no ha sido aún identificado.

El jugo de hojas de paraíso es utilizado como vermífugo en diferentes partes del mundo. También se lo utiliza sólo o en mezclas con otras hierbas como diurético y emenagogo. Cataplasmas de hojas o flores del árbol sirven para evitar las infecciones por piojos y otros ectoparásitos. Semillas molidas se aplican en terapias antirreumáticas y hay reportes que señalan a la corteza como remedio eficaz contra la lepra y otras enfermedades de la piel (30).

Los frutos son tóxicos para los animales domésticos y el hombre, produciendo diferentes grados de envenenamiento según el consumidor. Una preparación obtenida a partir de ellos, es utilizada en América como insecticida puesto que los cultivos que crecen a la sombra de estos árboles y rodeados por ellos no son atacados por áfidos u otros insectos dañinos (25).

Bhakuni y col. (22), encontraron que extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de semillas de *Melia azedarach* L. inhibían la multiplicación del virus Newcastle Disease (NDV).

En el marco de un estudio de sustancias antivirales de origen natural, en nuestro laboratorio se ha trabajado con extractos acuosos obtenidos a partir de distintas partes de plantas medicinales sudamericanas.

En el transcurso de dicha investigación se encontró que los extractos de hojas y raíces de *Melia azedarach* L., presentaban un amplio espectro de actividad antiviral "in vitro". Dichos extractos eran capaces de inhibir la

multiplicación viral cuando eran agregados al medio de cultivo luego de la infección. Entre los virus susceptibles se pueden citar los arenavirus Junin, Tacaribe y Pichinde, así como también los virus Polio, Estomatitis Vesicular (VSV), Sindbis, Herpes Simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), Pseudorrabia (PrV), Herpes Equino tipo 1 (EHV-1), Herpes Bovino tipo 1 (HBV-1) y en menor proporción el virus Aftosa (98, 99, 5, 37 y 32).

### **6.3.- Estudios sobre el mecanismo de acción del principio activo antiviral**

Una vez establecida la actividad antiviral ejercida por los extractos se analizó la citotoxicidad de los mismos.

El tratamiento con altas concentraciones de extracto crudo (0,6 mg./ml.) afectó la viabilidad de monocapas preformadas de células Vero y BHK-21, mostrando estas últimas una mayor sensibilidad luego de 24 h. de incubación a 37°C (3).

Sin embargo, sucesivos pasos de purificación de la actividad antiviral presente en el extracto, permitieron obtener un aumento de la actividad específica en ausencia de toxicidad para la célula huésped. Los ensayos realizados con células Vero indicaron que no hubo variación en el ritmo de crecimiento entre los cultivos controles y los tratados con la fracción semipurificada, tanto en la fase de crecimiento exponencial como en el período estacionario (3).

Se sabe que la actividad antiviral de los extractos no se debe a un efecto virucida, ya que luego de incubar "in vitro" una suspensión de viriones en presencia del extracto, estos conservan su infectividad (5).

Una particularidad de este antiviral es su capacidad de establecer en las células un estado refractario a la infección viral (98 y 6).

El antiviral actúa de manera diferente según el huésped utilizado (5 y 100). Cuando se emplean células Vero, el antiviral impide que el virus VSV se adsorba y penetre a las mismas. Sin embargo, Sindbis y VSV ingresan en células BHK-21 tratadas donde se inhibe la síntesis de ácido ribonucleico.

Los estudios "in vitro" realizados con HSV-1 y HSV-2 muestran que el tratamiento con el extracto no inhibe ni la adsorción ni la penetración viral a la célula pero sí su multiplicación. Resultados similares se obtuvieron con Pseudorrabia. En este caso la actividad antiviral se ejerce sobre un paso posterior a la entrada del virus a la célula (97).

La máxima actividad antiviral se alcanza cuando los cultivos celulares son incubados durante 2 h. en presencia de extracto antes de la infección, y se conserva aproximadamente 24 h., tiempo luego del cual decae. Sin embargo, la actividad se reestablece con la aplicación de una nueva dosis de extracto sobre los cultivos infectados (5 y 32).

Se encontró que meliacina requiere de un metabolismo celular activo para desencadenar el estado antiviral, ya que si se tratan las células con el extracto a 4°C, no se registra inhibición en la multiplicación viral. El mismo fenómeno se observa cuando el tratamiento se lleva a cabo en presencia de actinomicina D (6).

Con estos resultados, se puede inferir que el mecanismo de acción de meliacina requiere de la síntesis de-novo de algún factor celular a través del cual ejerce la inhibición de la replicación viral. Teniendo en cuenta esto, una posibilidad era que el extracto actuara como una sustancia similar al interferón o que fuera capaz de inducir interferón.

Sin embargo, se observó que células L-929 y cultivos primarios de fibroblastos de embrión de ratón tratados "in vitro" con el extracto eran incapaces de producir interferón independientemente del estímulo utilizado. Este efecto se manifestó cuando el extracto era agregado a los cultivos celulares antes, durante o poco tiempo después de la inducción con NDV o poli(rI)-poli(rC). Es importante destacar que también se inhibió la acumulación de interferón ácido resistente en el suero de animales tratados con el extracto por vía ip. (7).

Los ensayos sobre síntesis de ácido ribonucleico y proteínas en las células tratadas con meliacina, indican que no hay inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares, ya que los perfiles proteicos obtenidos en geles de

poliacrilamida de cultivos tratados no presentaron diferencias con los de cultivos controles (5, 32 y 97).

Sin embargo, se encontró que en las células tratadas la actividad de proteína quinasa disminuye ya que los extractos de células tratadas son incapaces de fosforilar la histona H1. Además, se observó una marcada disminución en el patrón de fosforilación de proteínas celulares (5, 32 y 6).

De este modo el producto inducido en los cultivos celulares por el tratamiento con meliacina, sería responsable de la modificación post-transcripcional de macromoléculas celulares a nivel de fosforilación.

El principio activo responsable de la actividad antiviral atribuida a extractos crudos de hojas de paraíso ha sido denominado meliacina y hasta el presente sólo se dispone de una caracterización química parcial del mismo. Se trata de un péptido cíclico de bajo peso molecular (2200-2300 D) que contiene aminoácidos alifáticos y una molécula de glucosa que se libera mediante un tratamiento alcalino suave, determinando la pérdida de actividad del compuesto (8).

#### 6.4.- Efectos de extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L. sobre la multiplicación viral "in vivo"

Los estudios llevados a cabo "in vitro" que indicaban que los extractos eran capaces de inhibir la multiplicación de un

amplio espectro de virus en ausencia de toxicidad para las células huésped, sirvieron como estímulo para el análisis "in vivo" del potencial uso de dichos extractos como agentes terapéuticos en enfermedades de etiología viral.

Considerando la amplia experiencia que nuestro laboratorio poseía en el sistema Tacaribe-ratón, este fue el primer modelo ensayado. Cuando los ratones lactantes recibían una dosis del extracto 24 h. antes de la infección con el virus por vía intracerebral y luego se continuaba el tratamiento durante 6 días consecutivos, se observó una disminución significativa de la mortalidad de los mismos. El título viral en cerebro se redujo y se evitó la diseminación del virus a otros órganos como hígado y riñón (35). Idénticos resultados se obtuvieron cuando las madres de los ratones lactantes fueron tratadas con el extracto (4), por lo que puede asegurarse que este último ejerce un efecto antiviral "in vivo".

Se encontró que los niveles séricos de interferón de animales infectados y tratados con el extracto son significativamente menores que los de los correspondientes controles infectados no tratados.

Por el contrario, en el modelo (HSV-1)-ratón, la administración del extracto aumentó la mortalidad del huésped en correlación directa con un aumento en la susceptibilidad de las células adherentes peritoneales a la infección con el virus (34).



El virus Tacaribe produce la muerte del huésped por una encefalitis de naturaleza inmunológica (26, 27, 21 y 85) y la competencia del sistema inmune es esencial para que el ratón escape a la infección con HSV-1 (38). Si los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L. fueran capaces de modificar la respuesta inmune, al igual que los obtenidos a partir de otros miembros de la familia *Meliaceae*, los resultados obtenidos "in vivo" con el extracto, podrían deberse no solamente a un efecto directo del tratamiento sobre el curso de la infección viral en el huésped sino a una acción del mismo sobre su sistema inmune. Se planteó entonces la necesidad de estudiar si los mencionados extractos ejercían algún efecto inmunomodulador.

**OBJETIVO**

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo investigar la presencia de propiedades inmunomoduladoras en los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L.. Para esto se analizará "in vivo" e "in vitro" el efecto de dichos extractos sobre distintos parámetros de la respuesta inmune del ratón adulto Balb/c.

# **MATERIALES Y METODOS**

## 1.- ANIMALES

Se emplearon ratones de la cepa endocriada Balb/c. Estos animales fueron provistos por el Bioterio del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, INTA, Castelar.

Para los experimentos de injerto contra huésped, se utilizaron ratones Balb/c e híbridos de la primera generación, F1(Balb/c x AKR/J) y F1(Balb/c x DBA/2). Por convención se nombra primero la cepa materna y luego la paterna. Estos animales fueron provistos por el Bioterio de la Sección Leucemia Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina.

En todos los casos se utilizaron ratones adultos de ambos sexos entre 8 y 24 semanas de vida.

## 2.- CELULAS

### 2.1.- Líneas celulares

Se emplearon células Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) y L-929 (fibroblastos de ratón) crecidas a 37°C en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM, Gibco) suplementado con 5% de suero de ternera (Gibco) inactivado por

calentamiento a 56°C durante 30 min y 50 µg./ml. de gentamicina (medio de crecimiento). El mantenimiento de las líneas celulares se realizó a igual temperatura en MEM suplementado con 2% del mismo suero inactivado y 50 µg./ml. de gentamicina (medio de mantenimiento).

Ambas líneas celulares, libres de micoplasmas, se mantuvieron en el laboratorio mediante dos pasajes semanales con medio de crecimiento.

## **2.2.- Células peritoneales adherentes (CPA) de ratón**

### **2.2.1.- Macrófagos residentes y no residentes**

Se emplearon ratones adultos (aproximadamente 60 días de vida) Balb/c normales o estimulados 48 h. antes por vía intraperitoneal (ip.) con 3 ml. de una suspensión autoclavada de almidón al 2% P/V en buffer salino fosfatado (PBS).

Para obtener los exudados peritoneales se procedió según se describe a continuación (116). Los animales se sangraron a blanco. Se realizó una incisión longitudinal en la línea media del abdomen sin dañar la membrana peritoneal. Luego de bañar esta membrana con alcohol etílico 70°, se inocularon en la cavidad peritoneal 5 ml. de MEM conteniendo 5 U/ml. de Heparina (Abbot). Después de masajear el área abdominal se drenó el

exudado a través de la misma aguja utilizada para la inoculación del medio.

La viabilidad de la suspensión celular obtenida, determinada por el método de exclusión de Azul Tripán (78) fue siempre superior al 95%. La proporción de macrófagos en el exudado peritoneal se determinó por tinción con naranja de acridina (48).

Para establecer los cultivos 60  $\mu$ l de una suspensión de CPA que contenía  $3 \times 10^4$  macrófagos se sembraron sobre pocillos de un portaobjeto acanalado. Después de 2 h. de incubación a 37°C en estufa gaseada (atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>), se removieron las células no adherentes y se cubrió con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contenía distintas concentraciones de extracto, continuando la incubación otras 24 h..

Al cabo de este período de incubación se dosó la capacidad fagocítica por un ensayo de opsoneritrofagocitosis y el metabolismo oxidativo por la técnica de quimioluminiscencia.

#### 2.2.2.- Polimorfonucleares (PMN)

Los animales utilizados como fuente de células recibieron por vía ip. 3 h. antes de ser sacrificados, una dosis de 3 ml. de caldo tioglicolato al 2%. En este caso, una fracción de CPA enriquecida en PMN se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en 2.2.1. Según recuento diferencial de leucocitos teñidos con

May Grnwald-Giemsa, dicha suspensión celular contenía 90% de PMN.

Se establecieron los cultivos sembrando en cada tubo Leighton 1 ml. de una suspensión de CPA que contenía  $2 \times 10^5$  PMN.

Se dejaron adherir las células durante 2 h. a 37°C, luego de lo cual se volcaron los sobrenadantes y se reemplazaron por medio de crecimiento o distintas diluciones del extracto en dicho medio.

Los cultivos se incubaron 4 h. a 37°C y luego se midió la capacidad fagocítica por un ensayo de opsoneritrofagocitosis y el estallido respiratorio por la técnica de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) (117).

### 2.3.- Células de bazo y ganglios de ratón

Se emplearon ratones normales para obtener las células según se detalla a continuación. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron el bazo o los ganglios (según se indique en cada caso). Las células se disgregaron contra mallas estériles de alambre fino de acero inoxidable. Se utilizó para lavar los órganos y recoger las células obtenidas medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 900 x g durante 10 min.. El sedimento celular



se lavó tres veces con el medio ya mencionado. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 ml. de RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino,  $10^{-5}$  M de 2- $\beta$ mercaptoetanol y 50  $\mu\text{g./ml.}$  de gentamicina (medio completo para linfocitos). Se contaron las células vivas en una cámara de Neubauer aplicando método de exclusión de azul tripán previa lisis de los glóbulos rojos.

Cuando las suspensiones celulares se utilizaron para inocular animales en la almohadilla plantar o por vía endovenosa (ev.), las concentraciones celulares se ajustaron de manera tal que la dosis celular a inocular correspondiera a volúmenes de 0,05 ml.

Cuando las suspensiones celulares se utilizaron para establecer cultivos, las concentraciones celulares se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml.

Los cultivos se establecieron en microplacas de 96 pocillos de fondo plano, sembrándose  $2 \times 10^5$  células en cada uno de ellos, en presencia de 4  $\mu\text{g./ml.}$  de Concanavalina A (Con A, Sigma Chemical Co), 10  $\mu\text{g./ml.}$  de Fitoheماغلوتينina-P (PHA, Sigma Chemical Co) o 25  $\mu\text{g./ml.}$  de Lipopolisacárido (LPS, Sigma Chemical Co) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en estufa gaseada (atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ ).

### 3.- VIRUS

El virus usado durante el desarrollo de las experiencias fue el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) serotipo Indiana mantenido en el laboratorio por pasajes en células Vero.

#### 3.1.- Preparación de stock viral

Se infectaron monocapas de células Vero con una multiplicidad de 0,1 unidades formadoras de placas (UFP) por célula. Se dejó adsorber el inóculo 1 h. a 37°C, agitando cada 20 min. Se volcó el sobrenadante y se incubó con medio de mantenimiento durante 20 h. a 37°C. Al cabo de este período se cosecharon los sobrenadantes, centrifugando 10 min. a 1500 x g para bajar restos celulares. El stock así obtenido se guardó a -70°C.

#### 3.2.- Titulación viral por el método de UFP

Se prepararon diluciones seriadas al décimo del stock viral en medio de mantenimiento. Se inocularon (por triplicado) botellas de 15 ml. con 0,2 ml. de cada dilución asegurando la correcta dispersión del inóculo en toda la monocapa de células Vero. Se dejó adsorber 1 h. a 37°C, se volcó el inóculo y se

cubrieron las células con 3 ml. de una mezcla volumen a volumen de agar 1,6% y medio de mantenimiento doble concentración. Una vez solidificado el medio de plaqueo, las botellas se incubaron en posición invertida 48 h. a 37°C. Al cabo de este tiempo, las monocapas fueron fijadas con formol al 10% V/V durante 30 min., se tiñeron con cristal violeta 1% durante 15 min. y se contaron las placas. El título se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Título} = n/v \times d$$

siendo  $n = n^\circ$  de placas contadas.

$v =$  volumen de inóculo.

$d =$  dilución viral.

El stock empleado en los experimentos tenía un título de  $4 \times 10^7$  UFP/ml.

#### 4.- MATERIAL VEGETAL

##### 4.1.- Recolección del material vegetal

Todos los extractos empleados se obtuvieron a partir de hojas verdes y sanas de *Melia azedarach* L (nombre vulgar Paraíso), recolectadas cada año durante los meses de noviembre a marzo en distintas zonas del Gran Buenos Aires. Estas hojas fueron lavadas con agua destilada, se escurrieron y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

#### 4.2.- Preparación de los extractos

Se hizo un homogenato en licuadora de hojas verdes de *Melia azedarach* L. usando buffer fosfato de potasio 10 mM, pH=7,2 adicionado con cloruro de potasio 0,35 M (1 g. de material vegetal por ml. de buffer de extracción). Se filtró a través de paño de algodón y se centrifugó 1 h. a 10000 x g para clarificar. El sobrenadante fue esterilizado por filtración (Fracción Extracto Crudo) siendo su concentración 62 mg. de material vegetal seco por ml. de solución. Toda la operación anterior se realizó a 4°C.

#### 4.3.- Determinación de la actividad antiviral de los extractos

La titulación se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos. Se pretrataron monocapas de células Vero ( $2,5 \times 10^5$  células aproximadamente) con diluciones seriadas al medio en medio de mantenimiento de las fracciones en que se deseaba testear la actividad antiviral. El volumen de cada dilución con que se pretrató fue de 100  $\mu$ l. El control de virus no fue pretratado. Luego de incubar 2 h. a 37°C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, las monocapas (control y tratadas) se lavaron con PBS y se desafiaron con VSV a una multiplicidad de 0,05 UFP/célula. Se dejó adsorber 1 h. a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se volcó el inóculo. Se

incubó con medio de mantenimiento a 37°C y se concluyó el experimento cuando el control de virus manifestó un efecto citopático neto. Cada titulación fue acompañada por un control de células (no tratado y no infectado).

El título se expresó como DE50/100µl calculadas por el método de Reed y Muench (1000).

Todos los extractos utilizados en el desarrollo del presente trabajo de tesis poseían actividad antiviral siendo el título la misma 220 DE50/100µl.

#### 5.- DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS

El porcentaje de células viables se determinó por el método de exclusión de azul tripán utilizando cámara de Neubauer, luego de distintos tiempos de incubación a 37°C en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto.

#### 6.- DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA

Las células fagocíticas expresan sobre su superficie receptores que reconocen específicamente la porción Fc de la

molécula de IgG. El efecto de los extractos sobre la capacidad fagocítica de CPA se estudió utilizando como sistema indicador la ingestión de glóbulos rojos de carnero (GRC) opsonizados.

### 6.1.- Opsonización de GRC

Se preparó una suspensión de GRC al 5% V/V en PBS. Se diluyó en el mismo buffer el suero de conejo anti GRC (suero hiperimmune) a la máxima dosis no aglutinante y se agregó a un volumen de la suspensión de GRC al 5% V/V, otro volumen del antisuero diluido, mezclando bien. Se incubó la mezcla 25 min. a 37°C en baño de agua con agitación periódica. Pasado este tiempo, se centrifugó en frío durante 10 min. a 2000 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 volumen de PBS.

### 6.2.- Ensayo de opsoneritrofagocitosis

Cultivos de CPA de ratón incubados durante 24 h. a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en presencia o ausencia de distintas diluciones de extracto, se lavaron con medio de mantenimiento y se desafiaron con 60 µl de una suspensión al 0,5% de GRC opsonizados en medio de crecimiento. Los cultivos se incubaron durante 1 h. a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, luego de lo cual se lavaron exhaustivamente con PBS (para sacar el exceso de

eritrocitos). Se fijaron las células con metanol durante 1 min. y se colorearon con Giemsa diluido (dilución 1:21 en agua destilada).

Se calculó en todos los casos el porcentaje de fagocitosis según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de fagocitosis} = (\text{n}^\circ \text{ cél. positivas} / \text{n}^\circ \text{ cél. total}) \times 100.$$

Se contaron por lo menos 100 células por cultivo.

Se consideraron células positivas para la fagocitosis a aquellas que incorporaron más de 4 GRC opsonizados.

Finalmente, se calculó la actividad antifagocítica por reducción de la capacidad fagocítica de células tratadas respecto de los controles, expresándose dicho título en DI50/60  $\mu$ l.

### 6.3.- Reversibilidad del efecto del extracto sobre la capacidad fagocítica

Se obtuvieron cultivos de CPA murinas residentes y se incubaron en ausencia (controles) o en presencia de la máxima concentración de extracto utilizada en medio de crecimiento (tratados) durante 24 h. a 37°C. Al cabo de este período, se volcaron los sobrenadantes y se lavaron los cultivos dos veces con 2 ml. de medio cada vez. Los cultivos se cubrieron con medio fresco y se continuó la incubación a 37°C. A distintos

tiempos después de retirar la dilución del extracto, se realizó el ensayo de opsoneritrofagocitosis.

#### 6.4.- Cinética de establecimiento del efecto del extracto sobre la capacidad fagocítica de macrófagos murinos

Para determinar cual era el tiempo necesario para que se manifestara el efecto de los extractos sobre la fagocitosis, se establecieron cultivos de células peritoneales residentes. Se los dejó adherir por incubación durante 2 h. a 37°C. Luego se volcaron los sobrenadantes y se los reemplazó por medio de crecimiento. En todos los casos, el ensayo de opsoneritrofagocitosis se realizó 24 h. después de establecido el cultivo pero a distintos tiempos antes de dosar la capacidad fagocítica, el medio se cambió por una dilución 1/10 del extracto en medio de crecimiento.

#### 7 - DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA PRODUCCION DE RADICALES LIBRES

La unión de un antígeno opsonizado a la superficie de una célula fagocítica va acompañada por un aumento brusco en el consumo de oxígeno que se conoce como estallido respiratorio.



La concentración de oxígeno en el medio disminuye conjuntamente con la aparición de radicales tóxicos oxigenados que se liberan y están relacionados con los fenómenos de inflamación y muerte celular.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre el metabolismo oxidativo se utilizaron las técnicas de quimioluminiscencia y reducción de azul de tetrazolio (NBT).

#### 7.1.- Opsonización de zimosan

Diez miligramos de zimosan fueron resuspendidos en 1 ml. de PBS y calentados durante 20 min. a 100°C. Luego de enfriar, se agregó a la suspensión 1 ml. de suero humano normal como fuente de complemento. La mezcla se incubó 30 min. a 37°C con agitación periódica. Luego se eliminó el suero por centrifugación y el zimosán opsonizado se resuspendió en PBS (concentración final= 10 mg./ml.).

#### 7.2 - Ensayo de quimioluminiscencia

Este ensayo permite dosar la generación de radicales libres que acompaña a la fagocitosis.

Se sembró en cada vial de vidrio 1 ml. de una suspensión de CPA murinas que contenía  $1 \times 10^6$  macrófagos. Las células se

dejaron adherir durante 2 h. a 37°C y luego el sobrenadante se reemplazó por 1 ml. de medio de crecimiento (cultivos controles) o igual volumen de una dilución del extracto en dicho medio (cultivos tratados). Los cultivos se incubaron 24 h. a 37°C y, luego se lavaron y se cubrieron con 1 ml. de solución de Hanks sin rojo fenol (este indicador interfiere con las mediciones). El ensayo de quimioluminiscencia se llevó a cabo en condiciones standard. La emisión se midió en un contador de centelleo líquido 1214 Rack Beta Pharmacia Wallatoy en el modo fuera de fase. El nivel basal fue contado durante 5 min. a partir del agregado del luminol (5-amino-2,3 dihidro-1,4-phthazinediona) a una concentración final de  $10^6$  M. Luego se agregaron a cada vial 0,1 ml. de una suspensión de zimosán opsonizado (10 mg./ml.) o 0,01 ml. de una solución de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato)  $8,3 \times 10^{-6}$  M. En ambos casos, la quimioluminiscencia se midió cada min. durante 30-60 min. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

### 7.3.- Ensayo de reducción de NBT

Este ensayo permitió valorar simultáneamente fagocitosis y metabolismo oxidativo.

El NBT es una sal que en su estado oxidado es amarilla y puede ser reducida por los aniones superóxido producidos por una célula metabólicamente activa. Al reducirse se transforma

en un complejo azul insoluble (formazán) que es fácilmente detectable en el citoplasma de las células por observación microscópica.

Los cultivos se realizaron sobre portaobjetos con pocillos.

Se sembraron en cada pocillo 60  $\mu$ l de una suspensión de CPA que contenía  $1 \times 10^5$  PMN. Las células se dejaron adherir por incubación durante 2 h. a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Al cabo de este período se retiró el sobrenadante y se lo reemplazó por 60  $\mu$ l de una dilución de extracto en medio de crecimiento (cultivos tratados) o por igual volumen de dicho medio (cultivos control). Los cultivos se incubaron 3 h. a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Luego, el sobrenadante se reemplazó por 60  $\mu$ l de medio de crecimiento suplementado con 0,5 mg. de NBT y 1 mg./ml. de zimozán opsonizado. Las células se incubaron 30 min. a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se reemplazó nuevamente el sobrenadante con medio de crecimiento y se continuó la incubación otros 30 min. a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, los cultivos se fijaron 1 min. con metanol y se colorearon con fucsina diluída.

En cada pocillo se contabilizaron: células totales como células que han incorporado más de 4 partículas de zimozán y células que presentan depósitos intracitoplasmáticos de la sal de formazán.

Paralelamente, se realizaron controles de reducción inespecífica del colorante encontrándose que estos valores nunca superan el 5%.

## 8 - DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LOS LINFOCITOS

### 8.1.- Ensayo de incorporación de (<sup>3</sup>H)Timidina

Luego de 72 h. de incubación de los cultivos de linfocitos, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto, se agregaron a cada cultivo de linfocitos, 10  $\mu$ Ci de (<sup>3</sup>H)Timidina (actividad específica = 6,7 Ci/mM Dupont, New Research Products, Boston, USA). Los cultivos se mantuvieron en estufa gaseada (atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C durante 18 h. A continuación, se cosecharon las células utilizando un cosechador automático para células y la radioactividad incorporada al ADN celular se midió en un contador Beta de centelleo líquido (Rack Beta Pharmacia Wallac Oy).

Cada ensayo fue realizado por triplicado.

## 8.2.- Efecto del extracto sobre la producción de interferón GAMMA (IFN)

### 8.2.1.- Inducción de IFN:

Se establecieron cultivos de linfocitos. Para ello  $2 \times 10^5$  células esplénicas fueron incubadas con 5  $\mu\text{g./ml.}$  de Con A en presencia o ausencia de distintas diluciones de extracto. A las 24, 48 y 72 h. de cultivo, se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos y se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$  para dosar IFN.

### 8.2.2.- Titulación de IFN gamma

Se utilizó el método de reducción del número de placas de VSV en células L-929.

Se pretrataron 24 h. a  $37^\circ\text{C}$  en estufa gaseada (atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ ) monocapas de células L-929 (por duplicado) con diluciones seriadas al medio en medio de mantenimiento comenzando con la dilución 1/10 del sobrenadante en el que se deseaba testear IFN. Los controles no fueron pretratados. Finalizada esta incubación, todos los cultivos, tanto tratados como no tratados, se desafiaron con 100 UFP de VSV. Luego de 1 h. de adsorción del inóculo viral, las monocapas celulares se incubaron durante 48 h. con medio de plaqueo (50% V/V medio de mantenimiento doble concentración y metilcelulosa 1,4%). Al

cabo de este tiempo, las células se fijaron con formol 10% y las monocapas se colorearon con cristal violeta 10% para visualizar las placas de virus.

El título de IFN presente en los sobrenadantes se expresó como la inversa de la máxima dilución de los mismos, que redujo el número de placas de virus un 50% respecto de los controles infectados no pretratados.

#### **9.- DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

Se estudió la producción de anticuerpos hemaglutinantes y el número de células formadoras de anticuerpos (CFA), según se detalla a continuación, en grupos de 10 ratones Balb/c adultos sometidos o no a distintos esquemas de tratamiento con el extracto.

Considerando día 0 al de inmunización con GRC, los esquemas de tratamiento empleados fueron los que se muestran en el siguiente cuadro:

---

Días de tratamiento	Dilución extracto (mg./ml.)	Volumen inóculo (ml.)	Vía de inoculación
-2,-1,0,+1,+2	0	0,5	ip.
	3	0,5	ip.
	6	0,5	ip.
-2,-1,0	0	0,5	ip.
	3	0,5	ip.
	6	0,5	ip.

---

### 9.1.- Dosaje de anticuerpos hemaglutinantes

#### 9.1.1.- Inducción de anticuerpos hemaglutinantes en ratón

Los ratones tratados o no con el extracto recibieron por vía ip. 0,1 ml. de una suspensión de GRC al 30% V/V en PBS (día 0). Cinco días después de la inmunización, se sangraron a blanco por punción retroorbital. La sangre obtenida se incubó 1 h. a 37°C y luego una noche a 4°C. Se separó el suero en forma estéril. Se inactivó complemento por calentamiento a 56°C durante 30 min. y se guardó a -20°C hasta el momento de utilizar.

### 9.1.2.- Titulación de anticuerpos hemaglutinantes séricos de ratón

Se empleó una microtécnica para lo cual se usaron microplacas de 96 pocillos con fondo en "U" (55).

En primer lugar, se sembraron en cada pocillo 25  $\mu$ l de PBS. Luego, en los primeros pocillos de cada serie se sembraron 25  $\mu$ l de cada suero a dosar (previamente inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min.) y mediante microdiluidores de 25  $\mu$ l se hicieron diluciones seriadas al medio. Finalmente, en cada pocillo se agregaron 25  $\mu$ l de una suspensión de GRC al 1% V/V en PBS. Se disponía de un control con 50  $\mu$ l de PBS al que también se le agregó la suspensión de GRC.

Finalizado el procedimiento, la microplaca se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 2 h.. La lectura de los resultados se realizó cuando en el control se depositó el botón eritrocitario. Se consideró hemaglutinación positiva cuando el pocillo presentó un pseudotejido continuo y careció completamente de botón. La mayor dilución que mostró hemaglutinación positiva se consideró que contenía una unidad hemaglutinante (UHA).

El título hemaglutinante se expresó como la inversa de la última dilución que producía hemaglutinación positiva por ml.



## 9.2.- Ensayo de titulación de células formadoras de anticuerpos

### 9.2.1.- Obtención de células linfoideas para la técnica de CFA

Se extrajo el bazo de los ratones en los que se habían titulado anticuerpos hemaglutinantes. Se disgregó el órgano por perfusión con MEM sin suero. La suspensión celular se filtró por gasa y se centrifugó a 1000 x g durante 10 min.. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml. de MEM sin suero. Los glóbulos rojos presentes se lisaron por shock hipotónico con agua destilada. Pasados 20 segundos se diluyó con 10 ml. de medio sin suero. Se centrifugó a 1000 x g durante 10 min.. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 1 ml. de medio sin suero. Se contaron linfocitos en una cámara de Newbauer. Se ajustó la suspensión a  $10^6$  células/ml.

### 9.2.2.- Preparación de la cámara de Cunningham

Se pegaron cuatro pedazos de cinta adhesiva bifaz de 5 mm a lo ancho de un portaobjeto limpio dividiéndolo en tres áreas

iguales. Sobre la cinta se pegó otro portaobjeto limpio tal que quedaran formadas tres cámaras (36).

### 9.2.3.- Detección de CFA

Se procedió para esta determinación según explica Cunningham (504). Se dispuso de los siguientes materiales:

- suspensión de células linfoideas de ratón inmunizado con GRC (10<sup>6</sup> células/ml.)
- suspensión de células linfoideas de ratón no inmunizado con GRC(10<sup>6</sup> células/ml.)
- complemento: suero fresco de cobayo adsorbido 10 min. a 4°C con GRC.
- suspensión de GRC al 20% V/V en medio sin suero.

Se prepararon las siguientes mezclas de reacción:

Material	Control 1	Control 2	Experimental
medio sin suero	40 µl	60 µl	40 µl
linf. ratón inm.		100 µl	100 µl
linf. ratón no inm.	100 µl		
complemento	20 µl		20 µl
GRC	40 µl	40 µl	40 µl

Con una micropipeta se cargó la cámara con cada una de las mezclas de reacción midiendo el volumen. Se sellaron los bordes con parafina y se incubó 30 min. a 37°C. Finalizado el período de incubación, se contaron las placas de lisis con la ayuda de una lupa invertida.

El resultado se expresó como número de células formadoras de anticuerpos por bazo (CFA/bazo).

## 10.- DETERMINACION DEL EFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

### 10.1.- Reacción de injerto contra huésped

Se empleó el ensayo local de Ford y Simonsen (42) para evaluar la alorreactividad T. Este ensayo consiste en la inoculación de células inmunocompetentes de animales de una cepa endoriada A, en una de las almohadillas plantares de un híbrido F1 adulto derivado del cruzamiento entre la cepa A y otra cepa B. Este híbrido expresa los antígenos de histocompatibilidad de las células A injertadas. Por el contrario, las células A del injerto reaccionan frente a los antígenos de histocompatibilidad B expresados en las células del huésped F1, desencadenando una reacción de injerto contra huésped local, en la que fundamentalmente interesa el ganglio

poplíteo drenante de la almohadilla plantar inoculada. La reacción puede cuantificarse determinado el aumento de peso que se produce en este ganglio comparándolo con el peso del ganglio que drena la almohadilla plantar contralateral que recibió células singeneicas con el huésped.

Para llevar a cabo este ensayo, ratones F1(Balb/c x AKR/J) y F1(Balb/c x DBA/2) machos adultos fueron inoculados en la almohadilla plantar derecha por vía sub-cutánea con suspensiones celulares de bazo provenientes de animales de la cepa parental Balb/c. Como control, los huéspedes F1 fueron inoculados en la almohadilla plantar izquierda con el mismo número de esplenocitos de machos adultos singeneicos.

Siete días más tarde se procedió al sacrificio de los animales, disecando cuidadosamente los ganglios poplíteos derecho e izquierdo, que fueron luego secados y pesados en una balanza Mettler, con una precisión de 0,01 mg.

Se determinó la diferencia de peso entre cada par de ganglios como una medida de la capacidad alorreactiva de la cepa dadora frente a los antígenos de histocompatibilidad heredados por el F1 a partir de la otra cepa parental.

Para analizar el efecto de los extractos sobre esta respuesta, se dispuso de grupos de ratones F1 a los que se trató o no con distintas diluciones del extracto. El esquema de tratamiento consistió en una única dosis de extracto administrada conjuntamente con las células de la cepa parental, por vía ev.

## 10.2.- Reacción de hipersensibilidad retardada

En la reacción de hipersensibilidad retardada intervienen linfocitos T de hipersensibilidad retardada, células especializadas que han sido sensibilizadas por exposición a un antígeno. Al tomar contacto por segunda vez con el mismo antígeno, dichas células reaccionan proliferando y liberando citoquinas que atraen otros tipos celulares al lugar del desafío, en el que se produce una reacción de tipo inflamatorio.

Se inocularon ratones por vía ip. con 0,2 ml. de una suspensión celular que contenía  $1 \times 10^6$  GRC (día 0). Los mismos animales recibieron, 7 días más tarde (día +7), 0,05 ml. de una suspensión de GRC conteniendo  $1 \times 10^8$  células, por vía subcutánea en la almohadilla plantar derecha mientras que la izquierda recibió igual volumen de PBS. Luego de 24 h. (día +8), se midió el grosor de ambas almohadillas utilizando un calibre. La diferencia de grosor entre ambas almohadillas se consideró como medida de la respuesta despertada en el huésped por el antígeno.

Para analizar el efecto de los extractos sobre esta respuesta, se sometieron distintos grupos de ratones a los siguientes esquemas de tratamiento.

---

Días de tratamiento	Dilución extracto (mg./ml.)	Volumen inóculo (ml.)	Vía de inoculación
-2 a +7	0	0,1	ev.
	3	0,1	ev.
	6	0,1	ev.
-2 a 0	0	0,1	ev.
	3	0,1	ev.
	6	0,1	ev.
+5 a +7	0	0,1	ev.
	3	0,1	ev.
	6	0,1	ev.

---

#### 11.- ANALISIS ESTADISTICO

Todos los estudios estadísticos se realizaron utilizando el test "t" de Student (92).

# RESULTADOS

PARTE I: EFECTO DEL TRATAMIENTO IN VITRO CON EXTRACTOS ACUOSOS  
DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* L. SOBRE EL SISTEMA INMUNE  
DEL RATON

1.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach*  
sobre la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales  
murinos

Con el objeto de estudiar el efecto del extracto sobre la fagocitosis, se establecieron cultivos de macrófagos peritoneales de ratones normales (macrófagos residentes) o previamente estimulados con almidón (macrófagos no residentes). Dichas células se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto durante 24 h. antes de poner a prueba su capacidad fagocítica.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1.

El tratamiento con los extractos provocó una disminución significativa de la capacidad fagocítica de las células peritoneales hasta la mínima concentración ensayada. Como puede observarse en el Cuadro 1, este efecto inhibitorio se produjo independientemente del estado de activación celular, siendo la concentración que reducía al 50% el número de células fagocíticas 0,44 mg./ml. para los cultivos de macrófagos residentes y 0,22 mg./ml. para los no residentes.

Cabe señalar que la inhibición observada se manifiesta no solamente en una reducción del número de células fagocíticas



sino también en una disminución del número de GRC incorporados por célula (Figuras 1a y 1b).

**Cuadro 1**

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* L. SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS

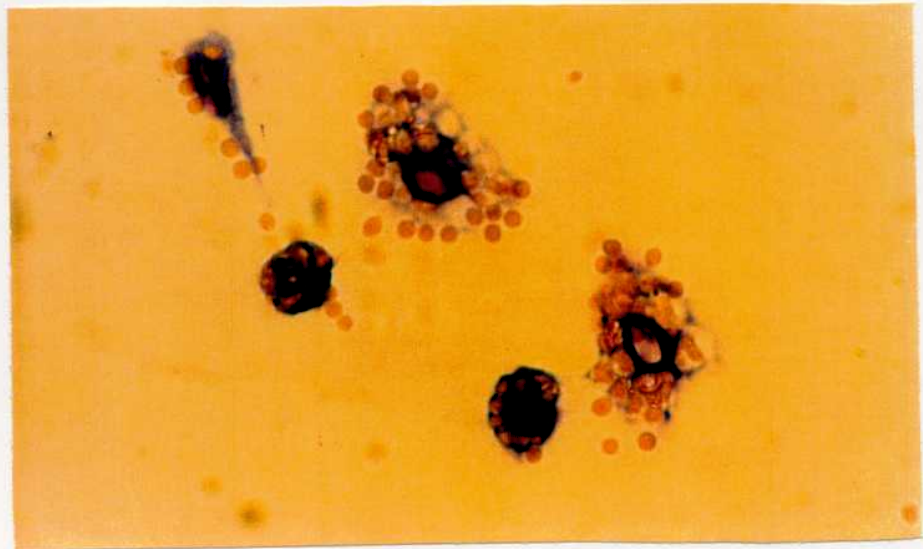
concentración de extracto (mg./ml.)	Porcentaje de células fagocíticas <sup>a</sup>	
	Residentes	Macrófagos No Residentes
6,24	3,17 ± 0,02 *	0,30 ± 0,04 *
3,12	8,30 ± 4,00 **	4,10 ± 2,00 *
1,56	22,00 ± 3,00 **	12,80 ± 5,00 **
0,78	41,90 ± 2,00 **	18,80 ± 9,00 **
0,39	51,40 ± 2,40 **	22,10 ± 2,20 **
0,19	67,00 ± 2,00 **	54,20 ± 1,70 **
0,00	86,10 ± 2,00	93,10 ± 0,20

<sup>a</sup> % células fagocíticas = (N°cél. positivas / N°cél. totales) x 100, considerando células positivas a las que incorporaron por lo menos 4 GRC.  
 Los valores se expresan como la media ± DS de tres mediciones independientes.  
 Diferencias significativas tratado vs control: \* p<0,01; \*\* p<0,025.

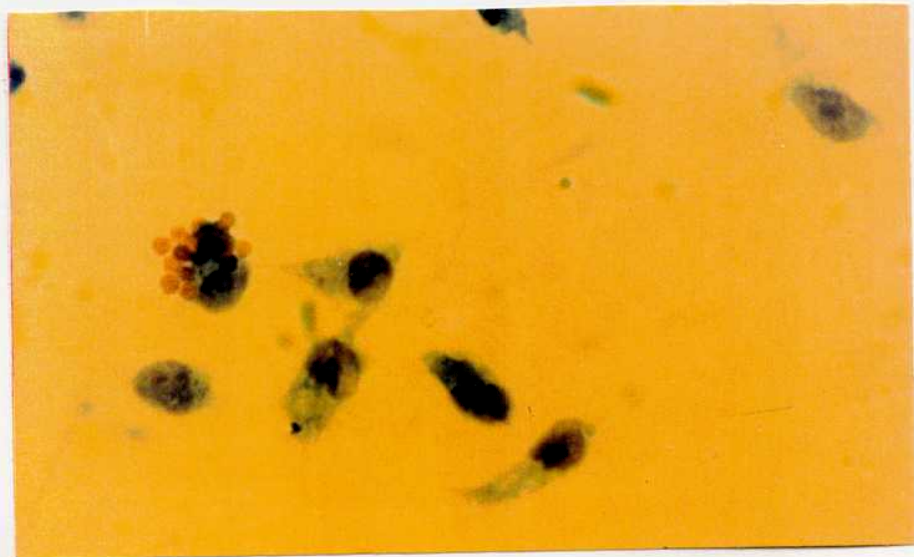
**1.1.- Toxicidad de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* para los macrófagos peritoneales murinos**

Ante la posibilidad de que la fagocitosis se encontrara disminuída por un efecto tóxico de los extractos sobre las

1a.- Cultivo control:



1b.- Cultivo tratado:



**Figura 1:** Aspecto de macrófagos peritoneales murinos incubados durante 24 h. en presencia de medio de cultivo (controles) o de 3,12 mg./ml. de extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach* L. (tratados) luego de llevar a cabo el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

células efectoras, se analizó la viabilidad de los cultivos luego de 24 h. de incubación en presencia de la máxima concentración de extracto ensayada, utilizando el método de exclusión de azul tripán.

El extracto resultó ser no tóxico para las células ya que el porcentaje de células viables en los cultivos tratados (95%) no disminuyó significativamente respecto al de los controles sin tratar (97%).

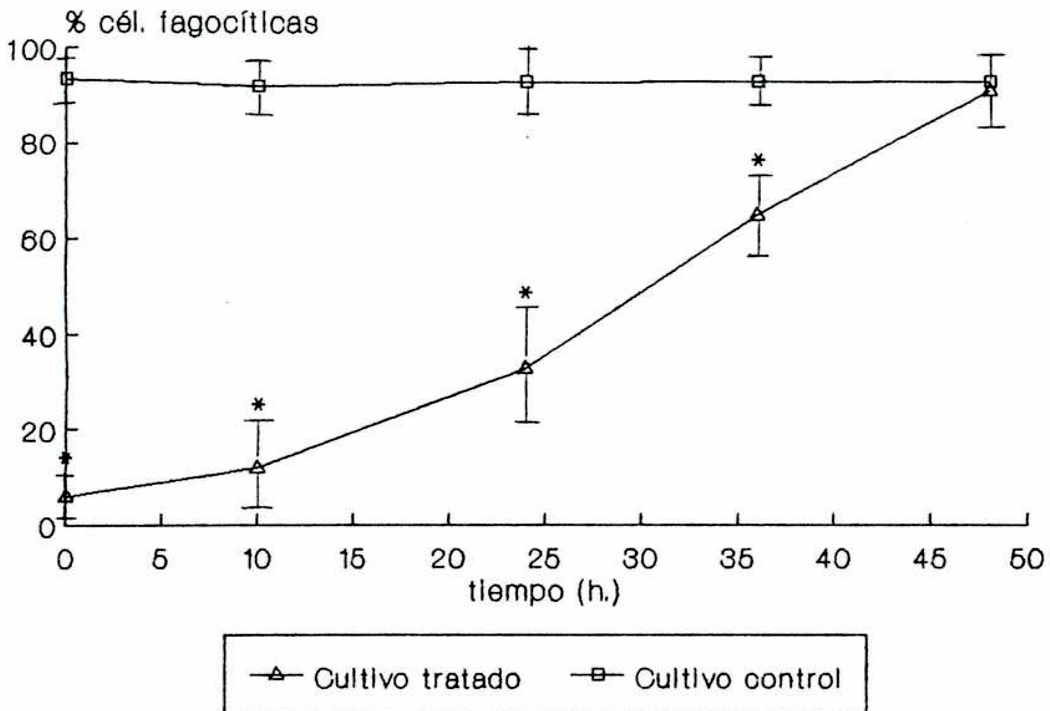
#### **1.2.- Reversibilidad del efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la fagocitosis de los macrófagos peritoneales murinos**

Para completar los estudios anteriores sobre la viabilidad de las células tratadas con el extracto, se decidió investigar si el efecto antifagocítico de los extractos era reversible.

Para ello se incubaron cultivos de macrófagos peritoneales residentes con la máxima concentración de extracto utilizada (6,2 mg./ml.) durante 24 h. y luego se dosó la capacidad fagocítica de las células a distintos tiempos después de retirar el extracto del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos se observan en la Figura 2.

El efecto antifagocítico fue revertido parcialmente 24 h. después de retirar el extracto del medio de cultivo y 48 h. de incubación sin extracto fueron necesarias para que las



**Figura 2:** Reversión del efecto antifagocítico de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L. sobre macrófagos peritoneales murinos

Suspensiones celulares que contenian  $3 \times 10^5$  macrófagos fueron incubadas durante 24 h. en presencia de medio de crecimiento o de 6,2 mg./ml. de extracto. A distintos tiempos después de retirar el extracto del medio de cultivo se dos  la capacidad fagocítica de las células mediante el ensayo de opsoneritrofagocitosis.

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de dos mediciones independientes.

Diferencias significativas tratado vs control: \*  $p < 0,05$ .

células tratadas recuperaran los niveles de fagocitosis de los controles.

La reversibilidad del fenómeno corrobora que las células no han muerto como consecuencia del tratamiento con el extracto, sino que este altera de manera transiente el metabolismo celular.

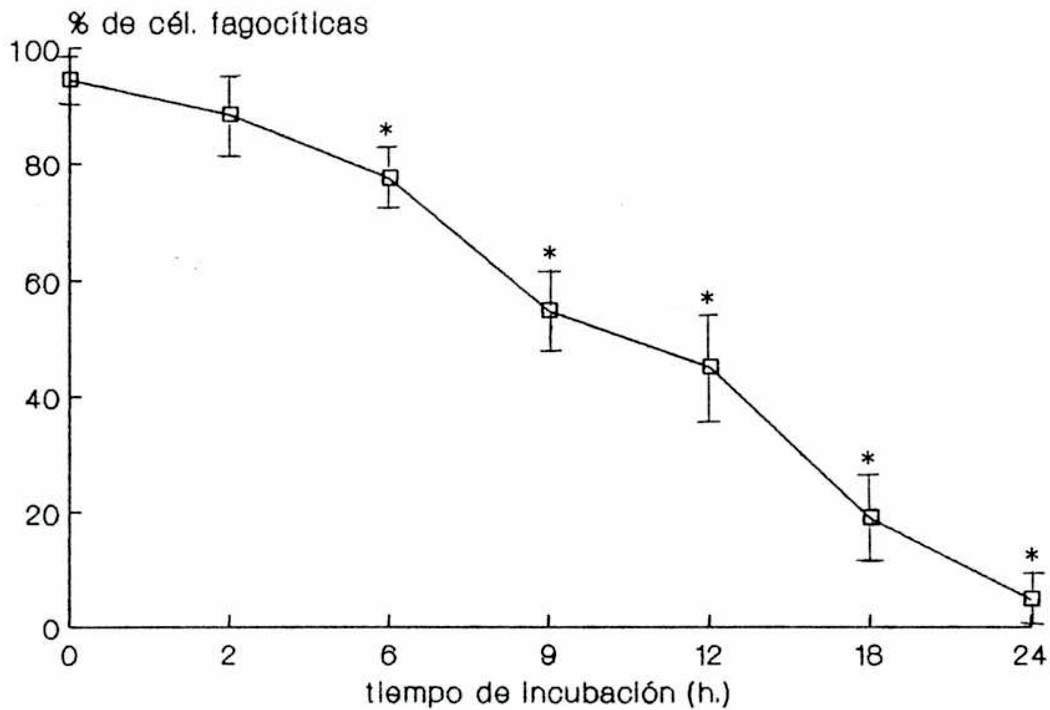
### **1.3.- Cinética de establecimiento del efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales murinos**

Se intentó determinar cuál era el tiempo mínimo de incubación de las células en presencia del extracto necesario para que se manifestara el efecto antifagocítico de este último.

Para ello, cultivos de macrófagos peritoneales residentes fueron sometidos a distintos tiempos de incubación en presencia de la máxima concentración de extracto ensayada, dosándose luego su capacidad fagocítica por el ensayo de opsoneritrofagocitosis.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.

Como puede observarse, 6 h. de incubación en presencia del extracto fueron necesarias para que se manifestara el efecto antifagocítico. Sin embargo, cabe señalar que el efecto inhibitorio resultó más acentuado al aumentar el tiempo de



**Figura 3:** Cinética de establecimiento del efecto antifagocítico de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre macrófagos peritoneales murinos.

Suspensiones celulares que contenían  $3 \times 10^5$  macrófagos residentes después incubadas distintos tiempos en presencia de 6,2 mg./ml. de extracto antes de dosar su capacidad fagocítica mediante el ensayo de opsoneritroftagocitosis

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de dos mediciones independientes.

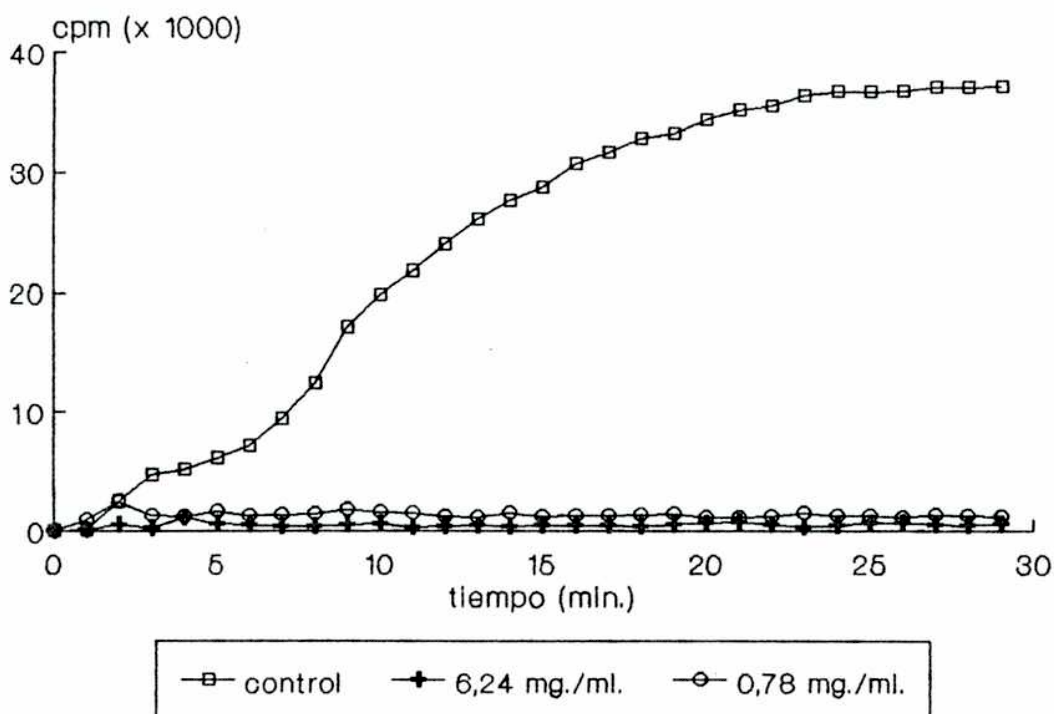
Diferencias significativas tratado vs control: \*  $p < 0,05$ .

incubación en presencia de dicho extracto.

#### 1.4.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre el metabolismo oxidativo de macrófagos peritoneales murinos

El período prolongado necesario para inducir el estado antifagocítico, comentado en el punto anterior, indicaba que el extracto no ejercía su efecto inhibitorio instantáneamente, lo cual disminuía la probabilidad de que actuara bloqueando receptores a nivel de la membrana celular. Una alteración del metabolismo celular como consecuencia del tratamiento resultaba más factible. Para corroborar esta última posibilidad, se analizó el efecto del tratamiento con distintas diluciones del extracto sobre el metabolismo oxidativo de las células mediante la técnica de quimioluminiscencia inducida por zimósán opsonizado según se explicó en el punto 7.2 de la sección Materiales y Métodos.

La Figura 4 muestra que la quimioluminiscencia de las células fue completamente bloqueada luego de 24 h. de incubación con las dos concentraciones de extracto ensayadas (6,24 mg./ml. y 0,78 mg./ml. respectivamente), mientras que en los cultivos controles la emisión alcanzó valores máximos 25 min después de desencadenar la respuesta. La inhibición observada concuerda



**Figura 4:** Efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la quimioluminiscencia inducida por zimosán de macrófagos peritoneales murinos.

Suspensiones celulares que contenían  $1 \times 10^6$  macrófagos residentes fueron incubadas durante 24 h. en presencia de medio de cultivo (controles) o de distintas concentraciones de extracto (6,24 mg./ml. y 0,78 mg./ml.). Su metabolismo oxidativo fue dosado por la técnica de quimioluminiscencia luego de agregar zimosán opsonizado y luminol.

Cada punto corresponde a la media  $\pm$  DS de dos mediciones independientes.



con la ausencia de partículas de zimosán asociadas a las células luego del tratamiento.

Para establecer si el efecto recién descrito era en realidad una consecuencia indirecta de la acción del extracto sobre la capacidad fagocítica de las células, se utilizó PMA como estímulo del metabolismo oxidativo. Este compuesto activa a la proteína quinasa C, desencadenando dentro de la célula la cascada de segundos mensajeros que conduce al estallido respiratorio sin necesidad de que haya interacción entre un ligando (antígeno opsonizado) y su respectivo receptor en la membrana celular.

Los resultados obtenidos se exponen en el Cuadro 2. Como se muestra en dicho cuadro, también en este caso, se pudo observar una inhibición de la quimioluminiscencia en los cultivos tratados. Aunque el PMA dispara una respuesta de cinética más lenta que la del zimosán opsonizado, las células tratadas exhiben una disminución significativa de la emisión 20 min después de la adición de PMA.

## **2.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la capacidad fagocítica y el metabolismo oxidativo de PMN**

Dado que los PMN constituyen otro grupo de células fagocíticas cuyo papel es muy importante en las respuestas

**Cuadro 2**

EFEECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* L. SOBRE LA QUIMIOLUMINISCENCIA DE MACROFAGOS MURINOS

----- Quimioluminiscencia (cpm) -----				
Tiempo (min)	control	concentración de extracto (mg./ml.)		
		6,24		0,78
10	972,00 ± 373,35	1048,50 ± 109,25	1865,50 ± 253,85	
20	7276,00 ± 756,89	476,50 ± 66,68 *	1465,15 ± 103,59 *	
30	2660,00 ± 823,89	4808,50 ± 278,95 *	2389,50 ± 220,69 *	
40	32684,00 ± 1934,64	11901,00 ± 675,00 *	8329,50 ± 825,40 *	

Suspensiones celulares que contenían  $1 \times 10^6$  macrófagos residentes fueron incubadas durante 24 h. en presencia de medio de cultivo (controles) o de distintas concentraciones de extracto (6,24 mg./ml. y 0,78 mg./ml.). Su metabolismo oxidativo fue dosado a distintos tiempos luego de agregar PMA por la técnica de quimioluminiscencia.

Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de 3 mediciones independientes.

Diferencias significativas tratado vs. control: \*  $p < 0,005$ .

inflamatorias agudas, se quiso estudiar si el extracto era también activo contra este tipo celular.

Previamente se determinó que el número de PMN en los cultivos decrecía más de 50% luego de 8 h. de incubación "in vitro". Esto obligó a descartar tratamientos de duración superior a las 2 h., período durante el cual el número de PMN por cultivo no decrecía significativamente.

Cultivos de CPA enriquecidas en PMN se incubaron durante 2 h. en presencia de medio de crecimiento o diluciones del extracto en dicho medio. Luego de este período de incubación se

dosó la capacidad fagocítica mediante el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

Como se observa en el Cuadro 3 no se obtuvieron diferencias significativas entre los cultivos control y los tratados durante 2 h. con distintas concentraciones de extracto.

### Cuadro 3

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE PMN UTILIZANDO LA TECNICA DE OPSONOERITROFAGOCITOSIS

Concentración de extracto (mg./ml.)	% de células fagocíticas <sup>a</sup>
6,24	84,14 ± 2,60 (N.S.)
3,12	88,09 ± 1,55 (N.S.)
1,56	85,59 ± 7,90 (N.S.)
0,79	86,14 ± 3,73 (N.S.)
0,00	89,81 ± 1,67

Suspensiones celulares que contenían  $1 \times 10^6$  PMN fueron incubadas durante 2 h. en presencia de medio de cultivo o de distintas concentraciones del extracto. Luego de este período de incubación se dosó la capacidad fagocítica de las células mediante el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

<sup>a</sup> % de células fagocíticas =  $(N^\circ \text{cél. positivas} / N^\circ \text{cél. totales}) \times 100$ , considerando células positivas a las que incorporaron por la menos 4 GRC.

Los valores se expresan como la media ± DS de tres mediciones independientes.

N.S. = no significativo.

Por otro lado, se estudió el efecto del extracto sobre el estallido respiratorio de los PMN inducido por PMA mediante el ensayo de reducción de NBT.

Los resultados se muestran en el Cuadro 4 e indican que el tratamiento con distintas concentraciones de extracto no afectó la capacidad de las células de reducir el NBT intracelularmente.

**Cuadro 4**

**EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE EL METABOLISMO OXIDATIVO DE PMN**

Concentración de extracto (mg./ml.)	% cél. NBT+ <sup>a</sup>
6,24	91,60 ± 7,68 (N.S.)
3,12	88,10 ± 9,86 (N.S.)
1,76	91,94 ± 5,91 (N.S.)
0,78	87,44 ± 2,04 (N.S.)
0,39	84,87 ± 11,59 (N.S.)
0,00	86,35 ± 9,59

Suspensiones celulares que contenían  $1 \times 10^6$  PMN fueron incubadas durante 2 h. en presencia de medio de cultivo o de distintas concentraciones del extracto. Luego se este período de incubación se dosó el metabolismo oxidativo al agregar PMA.

<sup>a</sup> % cél. NBT+ =  $(n^\circ \text{cél. que redujeron NBT} / n^\circ \text{cél. totales}) \times 100$ .

N.S. = no significativo.

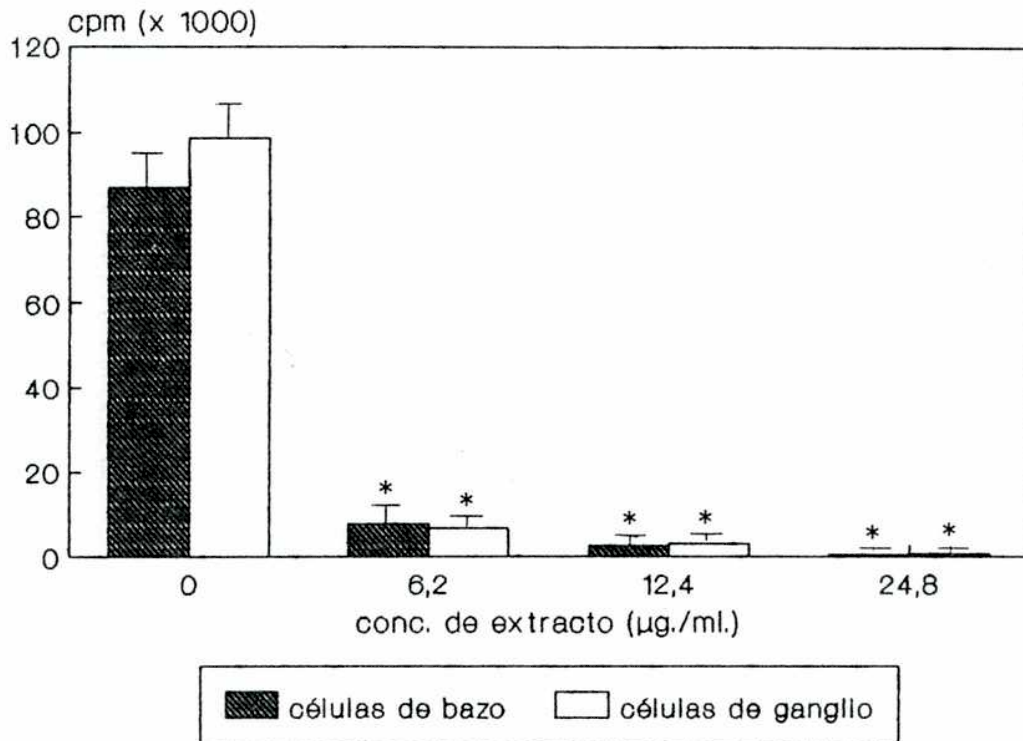
**3.- Efecto de los extractos extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la capacidad proliferativa de linfocitos murinos**

Los linfocitos, tanto B como T, son células responsables de gran parte de las respuestas del sistema inmune. Para

analizar el efecto del extracto sobre la proliferación de estos tipos celulares, se establecieron cultivos de células obtenidas de bazo y ganglio de ratón, estimulados o no con distintas lectinas, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto. Luego de 3 días de incubación, se cosecharon los cultivos y se cuantificó la proliferación mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada al ADN celular descrito en el punto 8.1 de la sección Materiales y Métodos. La elección de mitógenos con acción selectiva sobre cada una de las clases de linfocitos mencionados, permitió un estudio más completo y detallado de la acción inmunomoduladora del extracto.

Como se observa en las Figuras 5 y 6, los resultados obtenidos indican que el extracto inhibió significativamente la proliferación de células de bazo y de ganglio cualquiera sea el mitógeno utilizado. Se realizaron paralelamente cultivos control a los que se adicionó una dilución 1:10 del buffer con que se prepara el extracto. Los resultados obtenidos indicaron que dicho buffer no fue capaz de inhibir la proliferación celular. Por lo tanto, la inhibición de la misma observada en los cultivos tratados con extracto puede asignarse a principio/s presentes en las hojas de *Melia azedarach* L.

Cabe señalar que el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular ejercido por el extracto, se manifestó hasta la mínima concentración ensayada independientemente de la lectina utilizada como inductor (Cuadro 5).

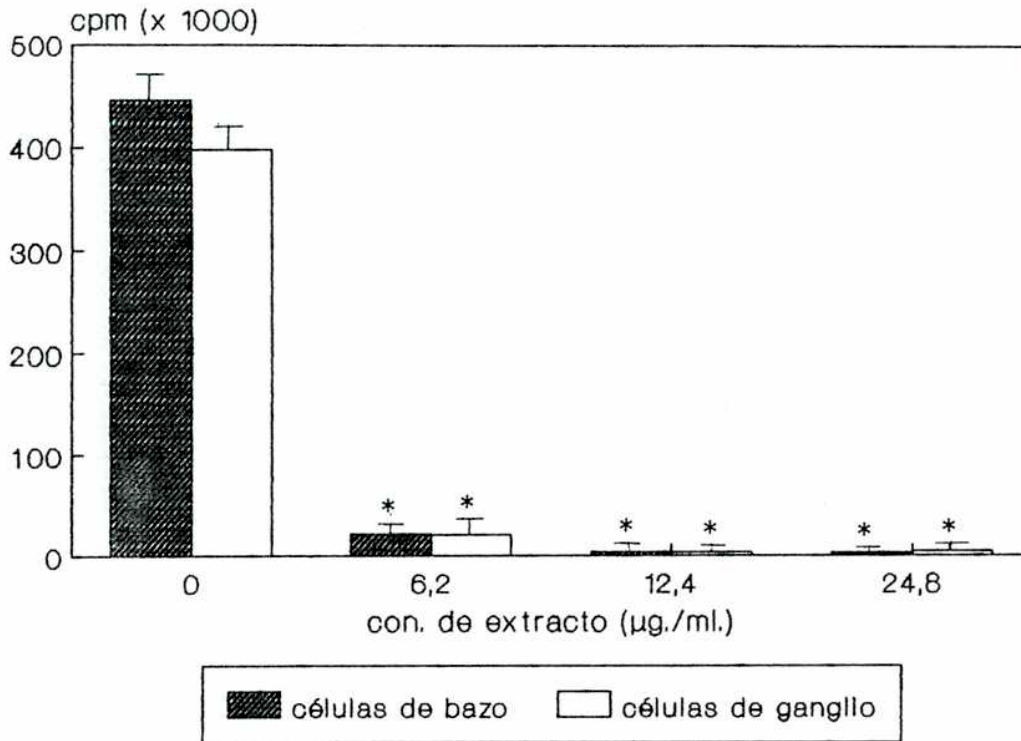


**Figura 5:** Efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la proliferación de células de bazo y de ganglio murinas estimuladas con Con A

$2 \times 10^5$  células de bazo o ganglio fueron incubadas durante 72 h. en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto con 5 µg./ml. de Con A como mitógeno. Finalizada esta incubación, se realizó un pulso de 18 h. de timidina tritiada y se cosecharon los cultivos cuantificándose la marca incorporada al ADN celular.

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de tres mediciones independientes.

Diferencias significativas tratado vs control: \*  $p < 0,005$



**Figura 6:** Efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la proliferación de células de bazo y de ganglio murinas estimuladas con LPS

$2 \times 10^5$  células de bazo o ganglio fueron incubadas durante 72 h. en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto con  $10 \mu\text{g./ml.}$  de LPS como mitógeno. Finalizada esta incubación, se realizó un pulso de 18 h. de timidina tritiada y se cosecharon los cultivos cuantificándose la marca incorporada al ADN celular.

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de tres mediciones independientes.

Diferencias significativas tratado vs control: \*  $p < 0,005$

**Cuadro 5**

CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS DE BAZO ESTIMULADAS POR DISTINTAS LECTINAS

concentración de extracto ( $\mu\text{g./ml.}$ )	Proliferación celular <sup>a</sup>	
	Con A (4 $\mu\text{g./ml.}$ )	LPS (10 $\mu\text{g./ml.}$ )
6,2	8,93 $\pm$ 0,96	4,97 $\pm$ 0,76
12,4	1,39 $\pm$ 0,40 *	0,93 $\pm$ 0,09 *
24,8	0,54 $\pm$ 0,10 *	0,69 $\pm$ 0,10 *
62,0	0,49 $\pm$ 0,08 *	0,11 $\pm$ 0,06 *
620,0	0,47 $\pm$ 0,05 *	0,11 $\pm$ 0,08 *

2 x 10<sup>5</sup> células de bazo fueron incubadas durante 72 h. en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto con 4  $\mu\text{g./ml.}$  de Con A o 10  $\mu\text{g./ml.}$  de LPS como mitógenos. Finalizada esta incubación, se realizó un pulso de 18 h. de timidina tritiada y se cosecharon los cultivos cuantificándose la marca incorporada al ADN celular.

<sup>a</sup> La proliferación celular se expresa como % marca incorporada al ADN celular respecto del control.

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de tres mediciones independientes.

Diferencias significativas tratado vs. control: \*  $p < 0,005$

**3.1.- Toxicidad de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* para los linfocitos murinos**

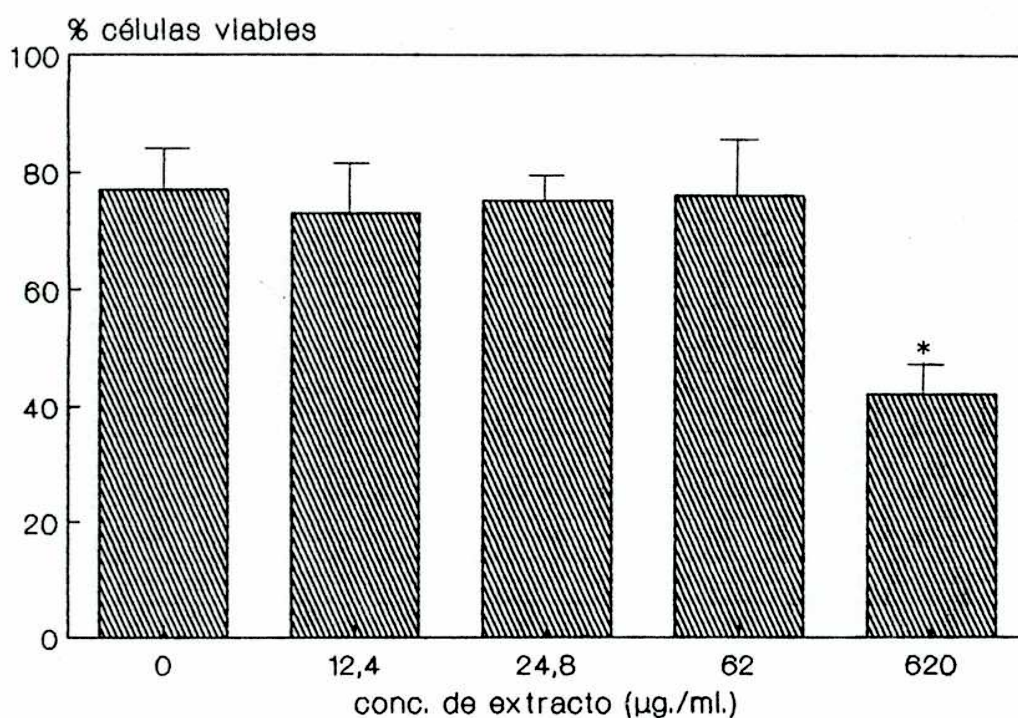
La importancia de los resultados obtenidos planteó la necesidad de dilucidar si la inhibición observada se debía a un efecto citostático o citotóxico del extracto sobre los linfocitos murinos.



Dado que una disminución en la incorporación de timidina tritiada puede deberse no sólo a la ausencia de división celular sino a la muerte de las células, se cuantificó el número de células viables por el método de exclusión de azul tripán luego de distintos tiempos de incubación de suspensiones de células esplénicas no estimuladas por lectinas en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto.

Los resultados se representan en la Figura 7. Como puede observarse, aproximadamente un 77% del número inicial de células sembrado permaneció viable luego de 72 h. de incubación con medio de cultivo. Cuando la incubación se llevó a cabo en presencia de 12,4  $\mu\text{g./ml.}$ , 24,8  $\mu\text{g./ml.}$  y 62  $\mu\text{g./ml.}$  de extracto no se observó una disminución significativa de la viabilidad celular respecto de los controles. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con 620  $\mu\text{g./ml.}$  de extracto se produjo una reducción significativa del porcentaje de células viables.

Si relacionamos los resultados presentados en la Figura 7 con los expuestos en el Cuadro 5, podemos deducir que la incubación de células con el extracto no provocó la muerte celular pero sí una alteración de su metabolismo que se evidencia en una disminución de la incorporación de timidina al ADN celular.



**Figura 7:** Efecto de extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la viabilidad de linfocitos murinos

La viabilidad se expresó como porcentaje de células viables determinado por la técnica de exclusión de azul tripán luego de 72 h. de incubación en presencia de medio de cultivo (control) o de distintas concentraciones de extracto en dicho medio (tratado).

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DS de tres mediciones independientes.

Diferencias significativas tratado vs. control: \*  $p < 0,05$

### 3.2.- Efecto de los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la producción de IFN gamma

La proliferación de linfocitos está acompañada por la producción de diferentes interleuquinas que desempeñan, según el caso, papeles importantes en la regulación de la respuesta inmune. Una de estas interleuquinas es el IFN gamma.

Con el propósito de establecer el efecto del extracto sobre la producción de IFN gamma, se establecieron cultivos de células esplénicas de ratón estimulados por 5 µg./ml. de Con A en presencia o ausencia de 12,4 µg./ml. de extracto y luego de distintos tiempos de incubación (1 a 5 días), se cosecharon los sobrenadantes. Los títulos de IFN se expresaron en dosis inhibitorias 50% (DI50%), es decir como la inversa de la máxima dilución de sobrenadante capaz de reducir al 50% el número de UFP producidas por el virus VSV en monocapas de células L-929.

Los resultados expuestos en el Cuadro 6 muestran que el tratamiento de las células con el extracto provoca una disminución significativa de su capacidad de producir IFN. Mientras que los sobrenadantes de cultivos controles presentan un título máximo 48 h. después de iniciado el cultivo (192 DI50%/ml.), en los tratados los títulos alcanzados siempre permanecen a nivel basal (< 10 DI50%/ml.).

Cuadro 6

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS ACUOSOS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE LA PRODUCCION DE IFN GAMMA.

condiciones de cultivo <sup>a</sup>	Título IFN (DI50%/ml.) <sup>b</sup>				
	Días de cultivo				
	1	2	3	4	5
sin extracto	48	192	160	50	<10
con extracto	<10	<10	10	<10	<10

<sup>a</sup> Cultivos de células esplénicas inducidos con 5 µg./ml. de Con A fueron incubados en presencia o ausencia de 12,4 µg./ml. de extracto. El sobrenadante se cosechó luego de distintos tiempos de incubación y se dosó IFN.

<sup>b</sup> El título de IFN presente en el sobrenadante de cultivos de 48 h. se expresó en DI50%, siendo igual a la inversa de la máxima dilución que reduce al 50% el número de UFP producidas por el virus VSV en células L-929.

PARTE II: EFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO CON EXTRACTOS ACUOSOS  
DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* L. SOBRE EL SISTEMA  
INMUNE DEL RATON

1.- Capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales obtenidas a  
partir de animales tratados con extractos acuosos de hojas  
de *Melia azedarach*

Se inocularon ratones adultos, dos días consecutivos por vía ip., con una dosis diaria de extracto (0,5 ml. de una dilución 1/10 que contenía 6,2 mg./ml. de extracto) (tratados) o con PBS (controles). A distintos días pi., se sacrificaron los animales, determinándose el porcentaje de células fagocíticas por un ensayo de opsonoeritrofagocitosis. Además, se contabilizó para cada caso el número de células peritoneales presentes en los exudados de cada animal.

Los resultados se exponen en el Cuadro 7.

No se observaron diferencias significativas entre animales controles y tratados en el número de células peritoneales totales, pero los animales tratados muestran una variación marcada del porcentaje de células capaces de fagocitar GRC opsonizados de la población de CPA.

Cuadro 7

EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE RATONES CON EXTRACTOS ACUOSOS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE SUS CPA

	Días pi.	N <sup>a</sup>	N° Células totales (x 10 <sup>6</sup> )	% células fagocíticas <sup>b</sup>
Tratados	1	3	2,10 ± 0,01	95.00 ± 3.00 (N.S.)
	2	3	2,30 ± 0,02	68.00 ± 22.00 (p<0.025)
	3	3	1,99 ± 0,01	97.00 ± 1.00 (N.S.)
	4	3	1,97 ± 0,03	65.00 ± 22.00 (p<0.025)
	5	3	2,00 ± 0,02	79.00 ± 8.00 (p<0.010)
Control	-	3	2,01 ± 0,01	91.00 ± 2.00

Se dosó la capacidad fagocítica de suspensiones de CPA que provenían de animales tratados o no con extracto a distintos tiempos pi. mediante el ensayo de opsoneritrofagocitosis.

<sup>a</sup> N = número de animales por experimento.

<sup>b</sup> % células fagocíticas = (N°cél. positivas / N°cél. totales) x 100, considerando células positivas a las que incorporaron por lo menos 4 GRC.

Los valores se expresan como la media ± DS de dos mediciones independientes.

N.S. = no significativo

## 2.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach* sobre la respuesta inmune humoral

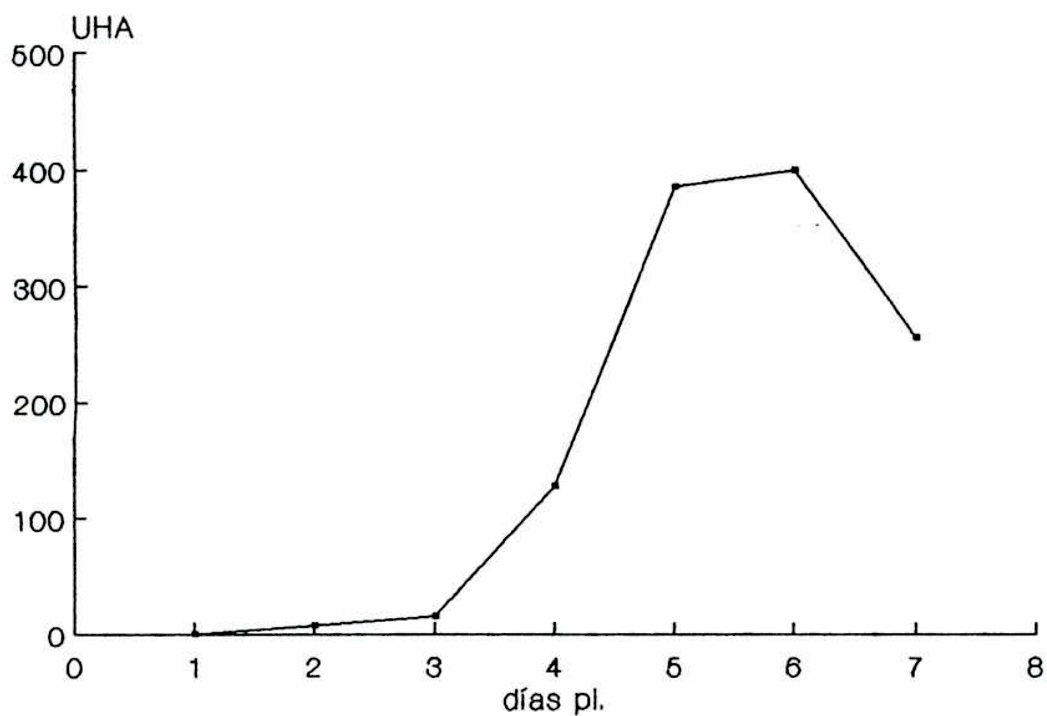
Con el objeto de estudiar si el extracto inducía algún tipo de modificación sobre la respuesta inmune humoral, se estudió el efecto de distintos esquemas de tratamiento con dicho extracto sobre la producción de anticuerpos hemaglutinantes y el número de CFA por bazo.

## 2.1.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach* sobre la producción de anticuerpos hemaglutinantes

Antes de iniciar este grupo de experimentos, fue necesario conocer la cinética de producción de anticuerpos hemaglutinantes con el objeto de establecer el momento óptimo de recolección de los sueros. Para ello, se inmunizaron ratones adultos Balb/c con 0,1 ml. de una suspensión de GRC al 30% en PBS administrada por vía ip. (día 0) y a distintos tiempos postinmunización se sangraron los animales y se titularon los sueros.

Como puede observarse en la Figura 8, los títulos de anticuerpos hemaglutinantes fueron máximos entre el día +5 y el +7 postinmunización declinando hacia el día +8. Se decidió sangrar los animales el día +5 en el resto de los experimentos.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la producción de anticuerpos hemaglutinantes, se dispuso de grupos de animales sometidos a dos tratamientos diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 8. Se observaron diferencias significativas entre los animales control, inoculados con PBS y los tratados con 6,5 mg./ml. de extracto (máxima concentración ensayada), se observa una disminución significativa en el título de anticuerpos hemaglutinantes con ambos tratamientos. Los animales tratados con dosis menores no



**Figura 8:** Cinética de producción de anticuerpos hemaglutinantes

Ratones adultos Balb/c fueron inmunizados con 0,1 ml. de una suspensión de GRC al 30% en PBS administrada por vía ip. (día 0) y a distintos tiempos postinmunización se sangraron los animales y se calculó el título de anticuerpos hemaglutinantes presentes en el suero.



presentaron diferencias significativas respecto de los controles.

**Cuadro 8**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE MELIA AZEDARACH SOBRE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES**

Tratamiento <sup>a</sup>	Conc. extracto (mg./ml.)	Vol. inóculo (ml.)	N <sup>b</sup>	título anticuerpos hemaglutinantes (UHA) <sup>c</sup>
-2,-1,0,+1,+2	0	0,5	14	113,14 ± 64,75
	3	0,5	11	113,45 ± 66,14 (N.S.)
	6,5	0,5	14	67,43 ± 18,90 (p<0,05)
-2,-1,0	0	0,5	6	120,00 ± 16,00
	3	0,5	10	149,00 ± 36,95 (N.S.)
	6,5	0,5	10	69,30 ± 24,40 (p<0,05)

Grupos de animales inmunizados con una suspensión de GRC al 30% en PBS, fueron sometidos a los esquemas de tratamiento indicados y se sangraron a blanco el día 5 postinmunización y se tituló la presencia de anticuerpos hemaglutinantes en suero.

<sup>a</sup> Se considera día 0 al día de inmunización. El extracto se administra por vía ip..

<sup>b</sup> N = número de animales por experimento.

<sup>c</sup> El título expresado en UHA se calculó como la inversa de la máxima dilución de suero que producía hemaglutinación total.

**2.2.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach* sobre el número de CFA**

Si se ponen en contacto "in vitro" linfocitos primados con un antígeno y el antígeno acoplado a glóbulos rojos o glóbulos

rojos normales (en el caso de que éste haya sido el antígeno) en presencia de complemento, se pueden observar zonas de lisis en un césped de glóbulos rojos, que indican la presencia de un linfocito que libera anticuerpos contra ese antígeno. Este es el fundamento de la técnica de CFA, empleada en este trabajo para completar la evaluación de la acción del extracto sobre la respuesta inmune humoral, teniendo en cuenta que existen reportes que indican que esta técnica es muy sensible y logra poner de manifiesto diferencias no observables por titulación de anticuerpos.

Para estudiar el efecto del tratamiento con el extracto sobre el número de CFA, se extirpó el bazo de los animales a los que se les habían dosado anticuerpos hemaglutinantes séricos.

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 9. El tratamiento correspondiente a la dosis de 6,5 mg./ml. produjo una alteración de la respuesta inmune humoral que se refleja en la disminución del número de CFA. Esto confirma los resultados obtenidos por titulación de anticuerpos hemaglutinantes.

Cabe señalar que si bien el número de CFA/bazo está significativamente disminuido en este caso, el número de células totales por bazo no se halla modificado respecto del de los controles.

Con respecto al tratamiento con dosis menores, no se observaron diferencias respecto de los controles en el número de CFA.

**Cuadro 9**

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE EL NUMERO DE CFA

Tratamiento <sup>a</sup>	Conc. extracto (mg./ml.)	Vol. inóculo (ml.)	N <sup>b</sup>	CFA/bazo
-2,-1,0,+1,+2	6,5	0,5	14	12100,00 ± 3627,67 **
	3	0,5	11	32628,57 ± 11123,21 *
	0	0,5	14	44000,00 ± 3274,00
-2,-1,0	6,5	0,5	10	20100,00 ± 3281,31 **
	3	0,5	10	30500,00 ± 3914,08 *
	0	0,5	6	30800,00 ± 1562,05

Grupos de animales inmunizados con una suspensión de GRC al 30% en PBS, fueron sometidos a los esquemas de tratamiento indicados y se sacrificaron en el día 5 postinmunización y se tituló el número de CFA.

<sup>a</sup> Se considera día 0 al día de inmunización. El extracto se administra por vía ip..

<sup>b</sup> N = número de animales por experimento.

Diferencias significativas tratados vs. control: \* no significativo; \*\* p<0,05

### 3.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de *Melia azedarach* sobre la respuesta inmune celular

Teniendo en cuenta los efectos inhibitorios ejercidos por el extracto sobre la proliferación de linfocitos inducida por lectinas, se decidió evaluar su efectividad en distintos modelos experimentales "in vivo" que pusieran en evidencia este aspecto de la respuesta inmune. Para ello se eligieron la reacción de hipersensibilidad retardada y la reacción de

injerto contra huésped, fenómenos en los cuales están implicados distintos tipos de células T.

### 3.1.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach* sobre la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por GRC

Con el fin de estudiar el efecto del extracto sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada, grupos de ratones sometidos o no a distintos tratamientos con dicho material fueron sensibilizados con una suspensión de GRC. Siete días más tarde, los animales fueron desafiados por segunda vez en la almohadilla plantar derecha con el mismo antígeno y luego de 24 h. se midió la hinchazón de dicha almohadilla plantar respecto de la izquierda como forma de cuantificar la intensidad de la respuesta inflamatoria desencadenada.

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 10. Considerando día 0 al día de sensibilización con GRC, cuando los ratones recibieron el tratamiento completo, es decir, una dosis diaria de extracto por vía ev. desde el día -2 al día +7, la supresión de la respuesta fue altamente significativa. Con el objeto de dilucidar si el extracto ejercía su efecto específicamente en alguna de las dos fases de la reacción (sensibilización o desencadenamiento) se ensayaron otros dos esquemas de tratamiento con la misma dilución del extracto: del

Cuadro 10

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

Tratamiento <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	Vía <sup>c</sup>	conc. extracto (mg./ml.)	Vol. inóculo (ml.)	hinchazón (mm.) <sup>d</sup>
-2 a +7	6	ev.	0	0,1	4,734 ± 1,68
	6	ev.	6	0,1	2,420 ± 0,32 (p<0,05)
	6	ev.	3	0,1	3,380 ± 1,79 (N.S.)
-2 a 0	6	ev.	0	0,1	3,910 ± 1,660
	6	ev.	6	0,1	1,330 ± 0,730 (p<0,05)
	6	ev.	3	0,1	4,550 ± 1,83 (N.S.)
+5 a +7	6	ev.	0	0,1	8,790 ± 1,756
	6	ev.	6	0,1	6,580 ± 2,440 (N.S.)
	6	ev.	3	0,1	7,432 ± 2,000 (N.S.)

<sup>a</sup> El extracto fue administrado en todos los casos por vía ev. siguiendo el esquema indicado. Se considera día 0 al día de sensibilización con GRC.

<sup>b</sup> N = número de animales por grupo.

<sup>c</sup> Vía de administración del extracto.

<sup>d</sup> La diferencia de tamaño entre las almohadillas plantares derecha e izquierda de cada animal se consideró parámetro para medir la respuesta de hipersensibilidad retardada.

N.S. = no significativo.

día -2 al 0 y del +4 al +7. Cuando el extracto fue administrado alrededor del momento de sensibilización, se obtuvieron resultados similares. En cambio, cuando el extracto fue administrado en la fase de desencadenamiento de la reacción, no se registró una inhibición significativa de la hinchazón.

### 3.2.- Efecto del tratamiento con los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* sobre la reacción de injerto contra huésped

Para evaluar el efecto del tratamiento con el extracto sobre el nivel de respuesta T frente a antígenos de histocompatibilidad extraños, se empleó el ensayo local de Ford y Simonsen según se describe en el punto 10.1 de la sección Materiales y Métodos.

En este grupo de experimentos, se desencadenaron reacciones de injerto contra huésped locales en híbridos F1 (Balb/c x AKR/J) o (Balb/c x DBA/J) adultos con esplenocitos de la cepa parental Balb/c. Los grupos de animales híbridos F1 recibieron simultáneamente por vía ev. 0,1 ml. de una dilución 1/10 del extracto en PBS (grupo tratado) o PBS sólo (grupo control).

Como puede observarse en el Cuadro 11, el tratamiento de los híbridos F1 adultos (Balb/c x AKR/J) con el extracto por vía ev. fue capaz de disminuir significativamente ( $p < 0.005$ ) la magnitud de la reacción de injerto contra huésped desencadenada con esplenocitos Balb/c adultos. Cuando el extracto fue administrado por vía sc. a los F1 adultos (Balb/c x AKR/J) no se alteró la reacción de injerto contra huésped respecto de los controles no tratados.

En las mismas condiciones experimentales, los esplenocitos Balb/c no modificaron significativamente la magnitud de la reacción en los híbridos F1 (Balb/c x DBA/J).

Cuadro 11

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *MELIA AZEDARACH* SOBRE LA REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED

Huésped	extracto <sup>a</sup>	Vía <sup>b</sup>	N <sup>c</sup>	Dador	Reacción de Injerto contra Huésped (mg.) <sup>d</sup>
(Balb/c x AKR/J)	no	-	4	Balb/c	1,20 ± 0,28
(Balb/c x AKR/J)	si	ev.	4	Balb/c	0,15 ± 0,12 *
(Balb/c x AKR/J)	si	sc.	4	Balb/c	1,15 ± 0,12 **
(Balb/c x DBA/J)	no	-	5	Balb/c	0,82 ± 0,50
(Balb/c x DBA/J)	si	ev.	5	Balb/c	0,63 ± 0,10 **
(Balb/c x DBA/J)	si	sc.	5	Balb/c	0,52 ± 0,30 **

<sup>a</sup> Todos los animales tratados recibieron una dosis de 0,1 ml. de una dilución de extracto crudo en PBS (6,2 mg./ml.).

<sup>b</sup> El tratamiento con extracto se realizó por distintas vías según el caso.

<sup>c</sup> N = número de ratones de cada grupo.

<sup>d</sup> La reacción de injerto contra huésped se cuantifica como la diferencia de pesos (expresada en mg.) entre los ganglios poplíteos derecho e izquierdo.

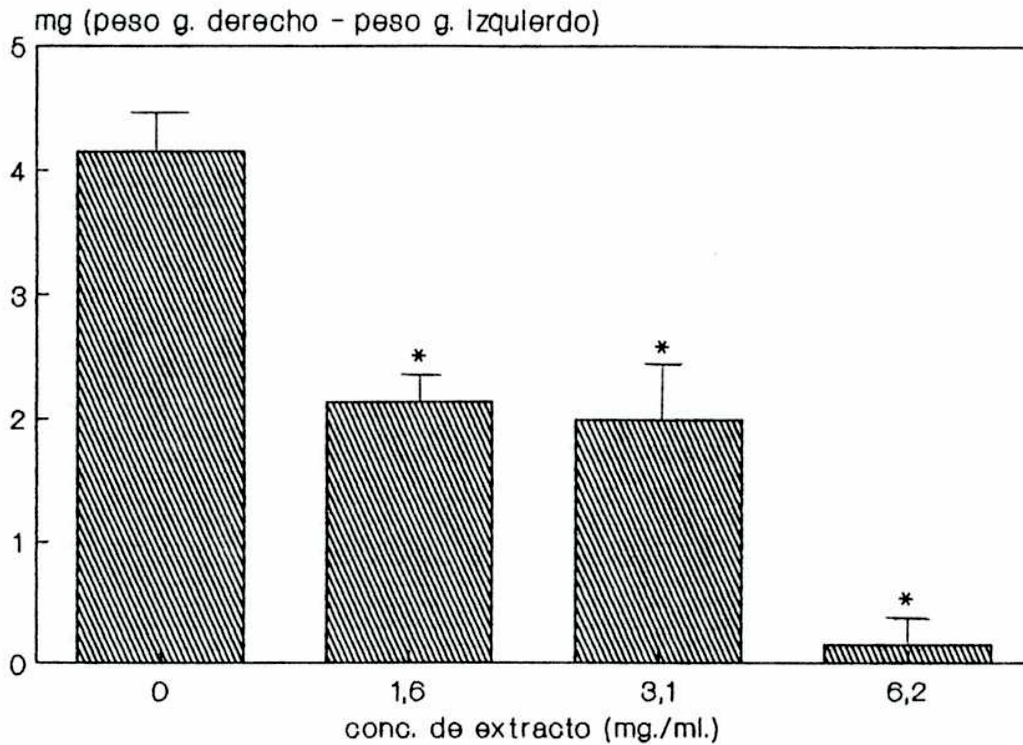
\* Diferencias significativas tratados vs. control: p<0,005

\*\* No significativo.

Una vez establecido que el tratamiento con el extracto por vía ev. era efectivo en suprimir la respuesta de Injerto contra Huésped cuando el huésped utilizado era F1(Balb/c x AKR/J), se analizó el efecto de distintas dosis de extracto sobre la reacción.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9 e indican que el extracto resultó activo en las tres dosis de tratamiento probadas, siendo el efecto dependiente de la dosis.





**Figura 9:** Curva dosis respuesta de la reacción de Injerto contra Huésped luego del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach*

Grupos de animales recibieron distintas dosis de extracto por vía ev..

Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres mediciones independientes.

<sup>a</sup> La reacción de injerto contra huésped se cuantifica como la diferencia de pesos (expresada en mg.) entre los ganglios poplíteos derecho e izquierdo.

\* Diferencias significativas tratados vs. control:  $p < 0,005$

\*\* No significativo.

## **DISCUSSION**

Las investigaciones llevadas a cabo durante varios años en nuestro laboratorio han establecido que los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L. son capaces de inhibir "in vitro" la replicación de gran variedad de ADN y ARN virus (98, 99, 5, 37 y 32) en ausencia de toxicidad para las células huésped (3). Estas propiedades estimularon la realización de estudios tendientes a evaluar la potencial utilización terapéutica de los extractos en enfermedades de etiología viral. Los primeros ensayos realizados en animales mostraron que la mortalidad de ratones lactantes infectados por vía intracerebral con el virus Tacaribe, disminuyó significativamente luego del tratamiento con dichos extractos (35). Por el contrario, la administración ip. de los extractos a hembras de la cepa endocriada Balb/c infectadas con Herpes Simplex tipo 1 por igual vía, aumentó la mortalidad de las mismas. Este hecho se correlacionó directamente con un aumento de la susceptibilidad de las CPA de dichos animales a la infección con el virus (34).

Teniendo en cuenta que el virus Tacaribe produce una encefalitis de naturaleza inmunológica (26, 27 y 85) y que la competencia del sistema inmune es esencial para que el ratón supere la infección con Herpes Simplex tipo I (38) se decidió estudiar si los extractos de *Melia azedarach* L. ejercían conjuntamente con su efecto antiviral alguna acción directa sobre el sistema inmune del ratón y los alcances de la misma.

Por otro lado, numerosos reportes indican que los extractos de hojas y semillas de *Melia azedarach* L. son utilizados por distintos grupos aborígenes para el tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorio (77).

Los extractos vegetales empleados en medicina natural para el tratamiento de distintas afecciones en las que interviene el sistema inmune constituyen un buen punto de partida para la búsqueda de compuestos inmunomoduladores, para lo cual se debe realizar una serie de ensayos que permitan evaluar el efecto de dichos compuestos sobre distintos aspectos de la respuesta inmune.

Las experiencias desarrolladas en el presente trabajo de tesis demuestran claramente que los extractos acuosos de hojas verdes de *Melia azedarach* L. son capaces de modificar significativamente distintos parámetros de la respuesta inmune del ratón adulto Balb/c.

Los primeros datos obtenidos en tal sentido indicaron que la capacidad fagocítica de CPA de ratón, resultaba inhibida luego de 24 h. de cultivo en presencia de distintas concentraciones del extracto (0,19 - 6,24 mg./ml.) (Cuadro 1). El alto índice de viabilidad luego del tratamiento (95%) conjuntamente con la reversión del estado antifagocítico (Figura 2) generado en las células, permitió descartar que la actividad inhibitoria registrada fuera consecuencia de un efecto tóxico de los extractos sobre dichas células.

Del mismo modo, se pudo comprobar mediante un ensayo de quimioluminiscencia, que los extractos eran capaces de afectar el estallido respiratorio de células fagocíticas inhibiendo su capacidad de generar radicales libres. Dicha inhibición se manifestó utilizando como inductor un estímulo fagocítico (zimosán opsonizado) o uno no fagocítico (PMA) (Figura 4 y Cuadro 2). Estos datos ponen en evidencia que los extractos acuosos de hojas verdes de *Melia azedarach* L. no sólo fueron capaces de impedir la ingestión de antígenos particulados sino que ejercieron un efecto directo sobre el metabolismo oxidativo de células fagocíticas.

Por el contrario, el tratamiento con distintas concentraciones de extracto no alteró ni la capacidad fagocítica ni el metabolismo oxidativo de PMN (Cuadros 3 y 4). Este resultado, que a primera vista resulta contradictorio, en realidad no lo es, puesto que la corta vida media de estas células hace imposible la aplicación de los tratamientos prolongados (más de 6 h.) necesarios para que se manifieste el efecto antifagocítico en los macrófagos murinos (Figura 3). Un resultado similar se observa cuando se analiza el efecto antiviral del extracto sobre distintas líneas celulares puesto que también se requieren al menos 2 h. de incubación con el mismo para que se manifieste el estado refractario a la infección viral en las células huésped tratadas (98 y 6).

Aunque los macrófagos son críticos para el control y eliminación de un gran número de patógenos, estas células

también pueden producir daño tisular asociado a la generación de metabolitos tóxicos oxigenados (11). Existen evidencias que indican que el anión superóxido puede modificar moléculas de IgG provocando su agregación. Estos agregados actuarían como estímulo para la generación de más aniones superóxido provocando así una reacción autoinmune que puede ser la causa de muchas inflamaciones crónicas como las asociadas a la artritis reumatoidea (70). Por lo tanto, los efectos inhibitorios observados en extractos de *Melia azedarach* L. sobre la generación de productos reactivos oxigenados podrían explicar, en parte, las propiedades antirreumáticas de preparaciones medicinales obtenidas de este árbol.

Otros miembros de la familia Meliaceae poseen propiedades similares. Los extractos acuosos de hojas de *Cedrela tubiflora* y *Trichilia glabra*, inhiben la actividad de algunos componentes del sistema inmune relacionados con la respuesta inflamatoria. La capacidad fagocítica y el metabolismo oxidativo de macrófagos murinos resultan significativamente inhibidos. Por otro lado, la fagocitosis de los leucocitos PMN, tanto humanos como murinos disminuye significativamente como consecuencia del tratamiento si bien éste no afecta la generación de radicales libres por parte de dichas células (18 y 19).

Labadie y col. (65) han demostrado que extractos acuosos de corteza de *Azadirachta indica*, otra Meliaceae, inhiben la quimioluminiscencia inducida por zimosán de PMN humanos aunque su capacidad para ingerir bacterias radioactivas no se altera.

Estos extractos exhiben un efecto anticomplementario, inhibiendo la capacidad hemolítica del suero de ratón tanto sobre la vía clásica como sobre la alterna (65 y 95). Así mismo, extractos obtenidos a partir de *Mumromia pumila* y *Melia azedarach* L., presentan una importante actividad anticomplementaria (66 y 20).

Por otro lado, en este trabajo de tesis pudo establecerse que el tratamiento con los extractos fue capaz de inhibir la multiplicación de células de bazo y de ganglio linfático de ratón estimuladas por distintas lectinas. Este efecto antiproliferativo resultó ser dependiente de la dosis y se manifestó con los dos mitógenos empleados, Con A (estimula preferentemente linfocitos T) y LPS (estimula preferentemente linfocitos B). La disminución significativa en la incorporación de timidina tritiada al ADN celular (Cuadro 5) podía deberse a un efecto tóxico de los extractos sobre la célula. Sin embargo, el número de células viables en los cultivos tratados y control permaneció constante. Paralelamente se dosó la presencia de IFN gamma en sobrenadantes de los cultivos, estableciéndose que el tratamiento de los extractos producía una inhibición significativa de los títulos de la interleuquina, probablemente como una consecuencia de la reducción de la tasa de proliferación celular (Cuadro 6).

Las propiedades antifagocíticas y antiproliferativas observadas "in vitro" eran muy promisorias puesto que ponían en evidencia que los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach*

L. contenían uno o más principios activos capaces de modificar distintos aspectos de la respuesta inmune del ratón y que estos efectos eran ejercidos sin toxicidad para las células huésped.

Recordemos que no todas las drogas capaces de modificar la respuesta inmune "in vitro" resultan verdaderamente efectivas cuando se las ensaya en modelos animales, por lo que una segunda fase de estudios tendientes a esclarecer la eficiencia "in vivo" de los extractos activos resultó necesaria.

Datos previos revelaban que el tratamiento con distintas concentraciones del extracto carecía de toxicidad tanto para los ratones adultos como para los lactantes (4). La posibilidad de que los extractos ejercieran un efecto tóxico sobre las células sanguíneas que se tradujera en una modificación de la población leucocitaria "in vivo" había sido descartada puesto que el tratamiento con el extracto no afectaba el número de leucocitos totales. El estudio hematológico de ratones normales y tratados, demostró que el extracto producía un aumento transiente del hematocrito y de la concentración de hemoglobina (17). Teniendo en cuenta el efecto antifagocítico del extracto "in vitro" e "in vivo" reportado en el presente trabajo de tesis, este aumento podría deberse a una disminución de la destrucción mediada por fagocitosis de los glóbulos rojos senescentes en tejidos reticuloendoteliales.

También se estudió que efecto ejercían los extractos sobre la respuesta inmune humoral hacia antígenos particulados. Pudo establecerse que el tratamiento de animales por vía ip. era



capaz de reducir significativamente la cantidad de anticuerpos hemaglutinantes séricos cuando se administraban 6,5 mg./ml. de extracto por dosis (Cuadro 8). Por otro lado, cuando el extracto era administrado por vía ev., no se observaban dichas variaciones en ninguna de las concentraciones ensayadas.

Una disminución en el número total de anticuerpos circulantes contra un antígeno determinado, en este caso eritrocitos de oveja, puede deberse a la existencia de un número menor de CFA o a que cada célula produzca menos anticuerpos. Para aclarar cual de las opciones explicaba los resultados obtenidos luego del tratamiento con el extracto, se tituló el número de CFA en el bazo de los ratones tratados, encontrándose resultados concordantes con los anteriormente mencionados. El tratamiento de animales con 6,5 mg./ml. de extracto por vía ip. producía una disminución significativa del número de CFA por bazo. A dosis menores, el efecto inhibitorio desapareció (Cuadro 9). Si bien los resultados obtenidos permiten afirmar que el número de células plasmáticas se encuentra significativamente disminuido, no podemos descartar que cada una de ellas produzca a su vez menor cantidad de anticuerpos. La disminución en el número de CFA podría deberse a un efecto directo de los extractos sobre la proliferación de los linfocitos B o de los linfocitos T que ayudan en esta respuesta o a que el tratamiento afectara a la presentación antigénica a cargo de células fagocíticas.

Por otro lado, se evaluó el efecto de los extractos sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada de animales inmunizados con GRC y sobre la reacción de injerto contra huésped, en las cuales están involucradas distinto tipo de células T.

La reacción de hipersensibilidad retardada no se manifiesta cuando el huésped toma contacto con el antígeno por primera vez pero si aparece en cualquier contacto subsiguiente con el mismo. En este tipo de reacción están involucrados fundamentalmente dos tipos celulares, macrófagos y linfocitos T de hipersensibilidad retardada. Cuando los linfocitos T de hipersensibilidad retardada sensibilizados por un antígeno determinado entran en contacto por segunda vez con dicho antígeno, liberan linfoquinas que atraen y activan a los macrófagos, desencadenándose así una reacción de tipo inflamatorio.

Para estudiar el efecto de los extractos sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada a GRC, una primera aproximación consistió en realizar un tratamiento que abarcara desde la inducción de la respuesta (día 0) hasta su desencadamiento (día 7). En este caso, se obtuvo una disminución significativa de la respuesta, dosada como hinchazón de la almohadilla plantar. Como el efecto inhibitorio observado podía ser una consecuencia de la acción del extracto sobre cualquiera de las mencionadas fases de la respuesta o sobre ambas a la vez, se realizaron dos tratamientos

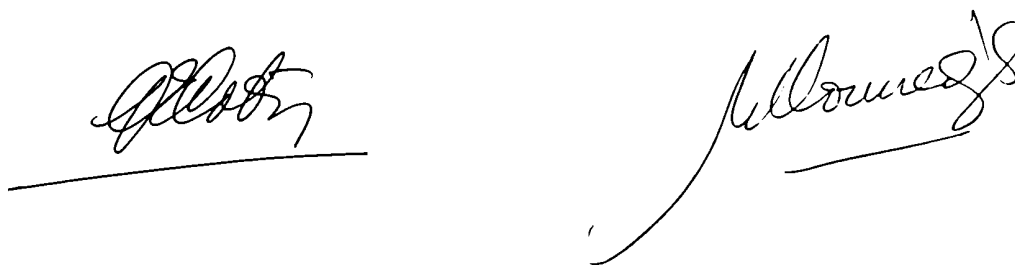
alternativos, uno durante la fase de sensibilización (-2 a 0) y otro durante la fase de desencadenamiento (+5 a +7) y pudo establecerse que el efecto inhibitorio sólo se observaba cuando el extracto se aplicaba en la primera fase, es decir que el tratamiento interfería con la sensibilización de las células T de hipersensibilidad retardada, involucradas en esa fase de la respuesta.

Las moléculas pertenecientes al Complejo Mayor de Histocompatibilidad tienen como función biológica central servir como marcadores de lo propio en el reconocimiento de antígenos extraños por parte de los linfocitos T. Se denomina alorreactividad T a la respuesta inmune llevada a cabo por las células T dirigidas hacia antígenos mayores de histocompatibilidad no propios. Entre los distintos modelos experimentales que permiten evaluar este aspecto de la respuesta inmune se halla la reacción local de injerto contra huésped puesta a punto por Ford y Simonsen, utilizada en este trabajo. Los resultados obtenidos indican que al inocular células de bazo de una de las cepas parentales (Balb/c) a ratones híbridos F1 (Balb/c x AKR/J) y F1 (Balb/c x DBA/J), sólo se observó una inhibición significativa de la respuesta, cuando una dosis de 6,2 mg./ml. de extracto era administrada por vía ev. al híbrido receptor F1 (Balb/c x AKR/J). No se obtuvo reducción de la respuesta cuando se empleó la misma dosis de tratamiento por vía sc.

Como ya hemos dicho, los extractos vegetales han sido y continuarán siendo importantes fuentes de productos biológicamente activos (13). La aplicación racional de los mismos implica necesariamente la purificación de los principios responsables de las actividades. Dicha purificación resulta compleja en muchas oportunidades puesto que la composición de los extractos es muy heterogénea y varía en función de factores tales como la edad de la planta, la estación del año en que se recolecta el material y el área geográfica de recolección (39). Si bien en muchos casos, las diversas actividades biológicas de un extracto pueden ser atribuidas a distintos compuestos presentes en dicho material, existen ejemplos en los cuales un único compuesto despliega más de una actividad. El ácido glicirricínico, compuesto obtenido a partir de extractos de raíces de *Glycyrrhiza glabra*, es activo contra distintos virus (10, 57, 58 y 83). Recientemente se ha establecido que dicho compuesto, al igual que otros alcaloides y saponinas, también posee propiedades antiinflamatorias (40 y 56). Del mismo modo, la ciclosporina, uno de los inmunosupresores de uso más generalizado, también ejerce, conjuntamente con sus efectos inmunomoduladores, actividad antiviral (28). Si bien, los extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L. poseen a la vez propiedades antivirales e inmunomoduladoras, hasta el momento, no se ha podido establecer si existe identidad química entre los principios activos responsables de ambas actividades.

Las modificaciones de la respuesta inmune desencadenadas por los extractos "in vivo" se correlacionan con los resultados obtenidos "in vitro" sobre la capacidad fagocítica de macrófagos y la proliferación de linfocitos, por lo que ambos ensayos resultarían adecuados para ser aplicados a lo largo del proceso de purificación de él o los principios activos presentes en los extractos. La determinación de la naturaleza química de dichos principios activos es un paso fundamental para evaluar la potencial aplicabilidad medicinal de los mismos.

En conclusión, los resultados expuestos en el presente trabajo de tesis indican que los extractos acuosos de hojas verdes de *Melia azedarach* L. poseedores de actividad antiviral, constituyen a su vez, una fuente potencial de compuestos activos sobre el sistema inmune, quedando pendiente la caracterización química y el estudio de los mecanismos de acción de dichos compuestos.

Two handwritten signatures are present at the bottom of the page. The signature on the left is written in dark ink and is partially obscured by a horizontal line drawn below it. The signature on the right is also in dark ink and is more clearly legible, with a horizontal line drawn below it.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- J. Abb, G.I. Baylass y F. Deinhardt (1979). Lymphocyte activation by tumor-promoting agent 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). *Journal of Immunology* 122, 1639 -.
- 2.- H.P.T. Ammon, T. Mack, G.B. Singh y H. Safayhi (1991). Inhibition of leucotriene by formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta Medica* 57, 203 -.
- 3.- G. Andrei, C.E. Coto, R.A. de Torres (1985). Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach* L.. *Revista Argentina de Microbiología* 17 (4), 187 -.
- 4.- G.M. Andrei, J.S. Lampuri, C.E. Coto y R.A. de Torres (1986). An antiviral factor from *Melia azedarach* L. prevents Tacaribe virus encephalitis in mice. *Experientia* 42, 843 -.
- 5.- G. Andrei (1988). Caracterización y purificación de un factor antiviral presente en la planta superior *Melia azedarach* L.. Determinación de su mecanismo de acción. Tesis Doctoral, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

- 6.- G.M. Andrei, E.B. Damonte, R.A. de Torres, C.E. Coto (1988). Induction of a refractory state to viral infection in mammalian cells by a plant inhibitor isolated from leaves of *Melia azedarach* L.. *Antiviral Research* 9, 221 -.
- 7.- G.M. Andrei, F.C. Coulombié, M.C. Courrèges, R.A. de Torres y C.E. Coto (1990). Meliacine, an antiviral compound from *Melia azedarach* L. inhibits interferon production. *Journal of Interferon Research* 10, 196 -.
- 8.- G. Andrei, A.S. Couto, R.M. Lederkremer y C.E. Coto (1994). Purification and partial characterization of an antiviral active peptide from *Melia azedarach* L.. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 5 (2), 105 -.
- 9.- K.T. Atherton y D.C. Burke (1978). The effects of some different inhibitors on interferon superinduction. *Journal of General Virology* 41, 229 -.
- 10.- M. Baba y S. Shigella (1979). Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus "in vitro". *Antiviral Research* 7, 99 -.
- 11.- J.A. Badwey y M.L. Karnovsky (1980). Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annual Review of Biochemistry* 49, 695 -.



- 12.- L.H. Bailey (1922). The standard cyclopedia of Horticulture. Macmillan, Nueva York, USA.
- 13.- M.F. Balandrin, J.A. Klocke, E.S. Wurtele y W.H. Hugh Bollinger (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science 228, 1154 -.
- 14.- L. Barbieri y F. Stirpe (1982). Ribosome-inactivating proteins from plants: properties and possible uses. Cancer Surveys 1, 489 -.
- 15.- H. Bartfeld (1977). Immunological studies demonstrating enhancing effect of aristolochic acid on immunoreactions. Arzneimittel-Forschung/Drug Research 27, 2297 -.
- 16.- R. Bauer, K. Redl y B. Dans (1992). Four polyacetylene glucosides from *Bidens campylothea*. Phytochemistry 31, 2035 -.
- 17.- F. Benencia, M.C. Courrèges y F.C. Coulombié (1992). Effect of *Melia azedarach* fresh leaf aqueous extract on mice hematological parameters. Fitoterapia 63 (5), 411 -.
- 18.- F. Benencia, M.C. Courrèges y F.C. Coulombié (1993). "In vitro" activity of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts over some components of the mouse inflammatory response. Libro de Resúmenes del Simposio organizado por la Red Latinoamericana

para la Investigación de Productos Naturales Bioactivos (LANBIO), Asunción.

19.- F. Benencia, M.C. Courrèges y F.C. Coulombié (1993). Actividades inmunosupresoras en extractos acuosos de hojas verdes de la planta superior *Trichilia glabra*. Libro de Resúmenes de la XXXVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas, Mar del Plata.

20.- F. Benencia, M.C. Courrèges, E.J. Massouh y F.C. Coulombié (1994). Effect of *Melia azedarach* L. leaf extrats on human complement and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 41, 53 -.

21.- S.C. Besuschio, M.C. Weissenbacher y G.A. Schmuís (1973). Different histopathological responses to arenavirus infection in thymectomized mice. *Arch. Gesamte. Virusforsh* 40, 21 -.

22.- D.S. Bhakuni, M.L. Dhar, M.M. Dhar, B.W. Dhawan y B.N. Mehratra (1969). Screening of plants for biological activity. Part II. *Indian Journal of Experimental Biology* 7, 250 -.

23.- K. P. Bhargava, W.B. Gupta, G.P. Gupta y C.R. Mitra (1970). Anti-inflammatory activity of saponins and other natural products. *Indian Journal of Medical Research* 58, 724 -.

- 24.- L.H. Block, A. Georgopoulos, P. Mayer y J. Drews (1978). Nonspecific resistance to bacterial infection. Enhancement by Ubiquinone-8. *Journal of Experimental Medicine* 148, 1228 -.
- 25.- O. Boelcke (1992). *Plantas Vasculares de la Argentina (nativas y exóticas)*. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, página 173.
- 26.- E.C. Borden, F.A. Murphy, N. Nathanson, T.P.C. Monath (1971). Effect of anti-lymphocyte serum on Tacaribe infection in infant mice. *Infection and Immunity* 3, 466 -.
- 27.- E.C. Borden, F.A. Murphy y N. Nathanson (1974). Tacaribe virus infection of the mouse: an immunopathologic disease model. *Laboratory Investigations* 30, 465 -.
- 28.- J.F. Borel (1989). Pharmacology of cyclosporine (Sandimmune). IV. Pharmacological properties "in vivo". *Pharmacological Reviews* 41 (3), 259 -.
- 29.- L.A. Boxer, J.M. Allen y R.L. Baehner (1978). Potentiation of polymorphonuclear leukocyte motile functions by 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 92, 730 -.

30.- H. Burkill (1966). A dictionary of economic products of the Malay peninsula, Tomo V, página 1465.

31.- V.S. Byers, W.L. Epstein, N. Castagnoli y H. Baer (1979). "In vitro" studies of poison oak immunity. 1. "In vitro" reactions of human lymphocytes to urushiol. Journal of Clinical Investigations 64, 1437 -.

32.- H. Cavaliere (1992). Inhibición de la multiplicación de Herpesvirus que afectan al ganado por un antiviral de origen vegetal. Seminario de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

33.- R.N. Chopra, S.L. Nayar, J.C. Chopra (1956). Glossary of indian medicinal plants. CSIR Publications, New Delhi, India, página 43.

34.- J. Claus, G.M. Andrei, C.E. Coto y R.A. de Torres (1988). HSV-1 intraperitoneal infection of Balb/c mice: effect of treatment with green leaf extract. Libro de Resúmenes Second International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Latin American Countries and the Caribbean Region, Mar del Plata, Argentina.

35.- F.C. Coulombié, G.M. Andrei, R.P. Laguens, R.A. de Torres y C.E. Coto (1992). Partially purified leaf extracts of *Melia*

*azedarach* L. inhibit Tacaribe virus growth in neonatal mice. *Phytotherapy Research* 6, 15 -.

36.- A.J. Cunningham y A. Szenberg (1968). Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology* 14, 599 -.

37.- A. Descalzo y C.E. Coto (1989). Inhibición del virus de pseudorrabia (Suid Herpesvirus 1) por la acción de un antiviral aislado de hojas de *Melia azedarach* L.. *Revista Argentina de Microbiología* 21, 133 -.

38.- I. Domke-Opitz y R. Zawattzky (1990). Natural Resistance to Herpes Simplex Virus infections: the macrophage-interferon axis. En: *Developments in Medical Virology*. L. Aurelian, Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, página 171 -.

39.- N.R. Farnsworth, O. Akerele, A.S. Bingel, D.A. Soejarto y Z. Guo (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of World Health Organization* 63 (8), 965 -.

40.- R.S.H. Finney y G.F. Somers (1958). The antiinflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* 10, 613 -.

- 41.- R.J. Flower and J.R. Vane (1974). En: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, H.J. Robinson and J.R. Vane (eds), Raven Press, New York, USA, página 9.
- 42.- W.L. Ford, W. Burr and M. Simonsen (1970). A lymph node weight assay for the graft-versus-host activity of rat lymphoid cells. *Transplantation* 10, 258 -.
- 43.- H. Franz, P. Ziska y A. Kindt (1981). Isolation and properties of three lectins from mistatloe (*Viscum album* L.). *Biochemical Journal* 195, 481 -.
- 44.- G. Franz (1989). Polysaccharides in Pharmacy: current applications and future conepts. *Planta Medica* 55, 493 -.
- 45.- T. Fujiwara, T. Takeda, Y. Ogiwara, M. Shimizu, T. Nomura y Y. Tomita (1982). Studies on the structure of polysaccharides from the bark of *Melia azadirachta*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 30, 4025 -.
- 46.- T. Fujiwara, E. Sugishita, T. Takeda, Y. Ogiwara, M. Shimizu, T. Nomura y Y. Tomito (1984a). Further studies on the structure of polisaccharides from the bark of *Melia azadirachta*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 32, 1385 -.

- 47.- R.H. Goldfarb y R.B. Herberman (1981). Natural Killer cell reactivity: regulatory interactions among phorbol ester, interferon, cholera toxin and retinoic acid. *Journal of Immunology* 126, 2129 -.
- 48.- P. Goldstein y H. Blomgren (1973). Further evidence for autonomy of T cells mediating specific "in vitro" cytotoxicity efficiency of very small amounts purified T cells. *Cellular Immunology* 9, 127 -.
- 49.- E.S. Golub y D.R. Green (1991). *Immunology: a synthesis*. Sinauer Associates Inc. , Massachusetts, U.S.A.
- 50.- C. Gopalakrishnan, D. Shankaranavayanan, L. Kameswaran y S. Naturajan (1979). Pharmacological investigations of Tylophorine, the mayor alkaloid of *Tylophora indica*. *Indian Journal of Medical Research* 69, 513 -.
- 51.- D.R. Green, P.M. Flood y R.K. Gershon. (1983) Immunoregulatory T-cell pathways. *Annual Review of Immunology* 1, 439 -.
- 52.- W. Grimm, E. Barlin, H.G. Leser, W. Kramer y D. Gemsa (1980). Induction of tumor cytostatic macrophages by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). *Clinical Immunology and Immunopathology* 17, 617 -.

- 53.- L.H. Hall, K.H. Lee, C.O. Starness, Y. Sumuda, R.Y. Wu, T.G. Wadell, J.W. Cochran y K.G. Gerhart (1979). Antiinflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. *Journal of Pharmaceutical Science* 68, 537 -.
- 54.- P.S.R.K. Haranath y K. Shyamala (1975). Experimental study on mode of action of *Tylophora asthmatica* in bronchial asthma. *Indian Journal of Medical Research* 63, 661 -.
- 55.- L. Hudson y P. Hay (1980). *Practical Immunology*. Alexander Thomas Blackwell Scientific Publications Ed., Edinburgo, Inglaterra.
- 56.- H. Inoue, T. Mori, S. Shibata y Y. Koshihara (1989). Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *Britain Journal of Pharmacology* 96, 204 -.
- 57.- M. Ito, H. Nakashima, M. Baba, R. Pauwels, E. De Clercq, S. Shigella y N. Yamamoto (1987). Inhibitory effect of glycyrrhizin on the "in vitro" infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV(HTLV-III/LAV)]. *Antiviral Research* 7, 127 -.
- 58.- M. Ito, A. Sato, K. Hirabayashi, F. Tanabe, S. Shigela, M. Baba, E. De Clercq, H. Nakashima y N. Yamamoto (1988).



Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus. *Antiviral Research* 10, 289 -.

59.- M.C. Ke, S.N. Wang, Y.C. Yao y C.F. Liu (1980). Extraction and an improved preparation method of enterolytic capsule of Anethole white blood cell increasing agent. *Chemical Abstracts* 94, 109240.

60.- F. Kiuchi, M. Shibuda y U. Sankawa (1982b). Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from ginger. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 30, 754 -.

61.- F. Kiuchi, M. Shibuda y U. Sankawa (1982a). Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Alpinia officinarum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 30, 2279 -.

62.- U. Knaus (1989). Komplementaktive Verbindungen aus der grunlippigen Muschel *Perna canaliculus* (Gmelin). Tesis de Doctorado, Universidad de Munich.

63.- Y. Kojima, S. Konno, S. Tamamura y T. Hashimoto (1980). Substance with interferon inducing activity. *Chemical Abstracts* 94, 52919 s.

64.- Y. Kojima, S. Konno, S. Tamamura, Y. Sano y T. Hashimoto (1980). Substance with interferon inducing activity by

extraction from a plant of the genus *Perilla*. Chemical Abstracts 93, 146618 a.

65.- R.P. Labadie (1986). Problems and possibilities in the use of traditional drugs. *Journal of Ethnopharmacology* 15, 221 -.

66.- R. P. Labadie, J.M. Van der Nat, J.M. Simmons, B.H. Kroes, S. Kosasi, A.J.J. Van der Berg, L.A. 't Hart, W.G. Van der Sluis, A. Abeysekera, A. Bamanuarachchi y K.T.D. de Silva (1989). An ethnopharmacognostic approach to the search for immunomodulators of plant origin. *Planta Medica* 55, 339 -.

67.- H. Lis y N. Sharon (1973). The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annual Review of Biochemistry* 42, 541 -.

68.- W. Losche, E. Michel, S. Heptinstall, S. Krause, W.A. Groewegen, G.P. Pescarmona, K. Thielmann (1988). Inhibition of the behaviour of human polynuclear leukocytes by an extract of *Chrysanthemum parthenium*. *Planta Medica* 54, 381 -.

69.- B. Luettig, C. Steinmuller G.E. Gifford, H. Wagner y H.L. Lohmann-Marthes (1989). Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinaceae purpurea*. *Journal of the National Cancer Institute* 81 (9), 669 -.

- 70.- J. Lunec, D.R. Blake, S.J. Mc Cleary, S. Brailsford y P.A. Bacon (1985). Self-perpetuating mechanism of immunoglobulin G aggregation in rheumatoid inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 76, 2084 -.
- 71.- W.S. May, S.J. Sharkis, A.H. Esa, V. Gebbia, A.S. Kraft, G.R. Pettit y L.L. Sensenbrenner (1987). Antineoplastic bryostatins are multipotential stimulators of human hematopoietic progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84, 8487 -.
- 72.- M. Modolell, R. Andreesen, W. Pahlke, U. Brugger y P.G. Munder (1979). Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyllysophospholipids. *Cancer Research* 39 (110), 4681 -.
- 73.- K.W. Nadharni (1954). *Indian Materia Medica*, Vol 1. Popular Book Depot, Bombay, India, página 1252.
- 74.- D.T. Okpako (1977). Prostaglandin synthetase inhibitory effect of *Azadirachta indica*. *Journal of the West African Science Association* 22, 45 -.
- 75.- S.N. Okpanyi y G.C. Ezeukuwu (1981). Anti-inflammatory and antipyretic activities of *Azadirachta indica*. *Planta Medica* 41, 34 -.

- 76.- L.R. Parodi (1959). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Acme, Buenos Aires, Argentina.
- 77.- N.G. Patel (1986). Indians traditional medicine: Ayurveda. En: Folk Medicine: the art and science. R.P. Steiner (Ed.), American Chemical Society, Washington DC, USA, página 57.
- 78.- M.K. Patterson (1979). Measurement of growth and viability of cells in culture. Methods in Enzimology 58, 141 -.
- 79.- G.R. Pettit, D.M.R. Barton, C.L. Weralg, J. Polonsky, J.W. Sonier y J.D. Connolly (1982). Evaluation of limonoids against the murine P 388 lymphocytic leukemia cell line. Journal of Natural Products 46, 379 -.
- 80.- G.R. Pettit, Y. Kamano y C.I. Herald (1987). Isolation and structure of bryostatins 10 and 11. Journal of Organic Chemistry 52, 2448 -.
- 81.- N.R. Pillai y G. Santhakumari (1981). Antiarthritic and antiinflammatory action of nimbidin. Planta Medica 43, 59 -.
- 82.- N.R. Pillai y G. Santhakumari (1984a). Effects of nimbidin on acute and chronic gastro-duodenal ulcer models in experimental animals. Planta Medica 50, 143 -.

- 83.- R. Pompei, O. Fiore, M.A. Marccialis, M.A. Pani y B. Loddo (1979). Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* 281, 689 -.
- 84.- L. Reed y H. Muench (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *Annual Journal of Hygiene* 27, 493 -.
- 85.- Y. Riviere, I. Gresser, J.C. Guillon y M.G. Tovey (1977). Inhibition by antiinterferon serum of lymphocytic choriomeningitis virus disease in suckling mice. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74, 2135 -.
- 86.- I. Roesler, CH. Steinmuller, A. Kiderlen, H. Emmendorfer, H. Wagner y M.L. Lohmann-Matthes (1991). Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. *International Journal of Immunopharmacology* 13 (1), 27 -.
- 87.- I.M. Roitt, J. Brostoff y D.K. Male (1993). *Immunology*. Mosby, Londres, Inglaterra.
- 88.- H. Rudiger (1982). Chemical examination of *Anacardium occidentale* - Isolation and structure determination of a novel biflavonoid-glycoside. *Planta Medica* 45, 3 -.

- 89.- K. Sandvig, S. Olsoes, A. Pihl (1976). Kinetics of binding of the toxic lectins Abrin and Ricin to surface receptors of human cells. *Journal of Biological Chemistry* 251, 3977 -.
- 90.- M.H. Schreier, G. Zenke, J.F. Borel y G. Baumann (1992). The continuing search for new immunomodulators. *Transplantation Proceedings* 24 (4), 19 -.
- 91.- S. Siddiqui y C.R. Mitra (1945). Utilization of Nim oil and its bitter constituents (nimbidin series) in the pharmaceutical industry. *Journal of Scientific and Industrial Research* 4, 5 -.
- 92.- R. Sokal y F.J. Rohlf (1980). *Biometry*, W.H. Freeman and Company, Nueva York, USA.
- 93.- G. Uhlenbruck (1981). Lectins, toxins and immunotoxins. *Naturwissenschaften* 68, 606 -.
- 94.- J.M. Van der Nat, J.P.A.M. Klerx, H. Van Dijk, K.T.D. de Silva y R.P. Labadie (1987). Immunomodulatory activity of an aqueous extraact of *Azadirachta indica* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology* 19, 125 -.
- 95.- J.M. Van der Nat, L.A. 't Hart, W.G. Van der Sluis, H. Van Dijk, A.J. Van der Berg, K.T.D. de Silva y R.P. Labadie (1989).

Characterization of anti-complementary compounds from *Azadirachta indica*. Journal of ethnopharmacology 27, 15 -.

96.- J.M. Van der Nat, W.G. Van der Sluis, L.A. 't Hart, H. Van Dijk, K.T.D. de Silva y R.P. Labadie (1992). Activity guided isolation and identification of *Azadirachta indica* bark extract constituents which specifically inhibit chemiluminescence production by activated human polymorphonuclear leukocytes. Planta Medica 57, 65 -.

97.- S. Villamil, L. Alché y C.E. Coto (1994). Inhibition of Herpes Simplex type 1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. Enviado para su publicación a Antimicrobial Chemistry and Chemotherapy.

98.- M. Wachsmann, V. Martino, G.O. Gutkind, J.D. Coussio, C.E. Coto y R.A. de Torres (1982). Antiviral activity of *Melia azedarach* plant extract. Fitoterapia 53, 167 -.

99.- M. Wachsmann, G.M. Andrei, M.G. Daelli y C.E. Coto (1984). Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de *Melia azedarach* L.. Acta Farmacológica Bonaerense 3 (1), 27 -.

- 100.- M.B. Wachsmann, E.B. Damonte, C.E. Coto y R.A. de Torres (1987). Antiviral effects of *Melia azedarach* L. leaves extracts on Sindbis virus infected cells. *Antiviral Research* 8, 1 -.
- 101.- T.G. Wadell, A.M. Austin, J.W. Cochran, K.G. Gebbart, Hall, I.N. y K.H. Lee (1979). Antitumor agents: structure-activity relationships in tenulin series. *Journal of Pharmaceutical Science* 68, 715 -.
- 102.- H. Wagner, B. Kreutzkamp y K. Jurcic (1985). Alkaloids from *Uncaria tormentosa* and their phagocytosis-increasing effect. *Planta Medica* 419 -.
- 103.- H. Wagner y A. Proksch (1985). Immunostimulatory drugs of fungi and higher plants. *Economic and Medicinal Plant Research* 1, 113 -.
- 104.- H. Wagner, A. Proksch, A. Vollman, B. Kreutzkamp, R. Bauer y K. Jurcic (1985). "In vitro" phagocytosis stimulation through isolated plants measured in the phagocytosis chemiluminescence (CL) model. *Planta Medica* 51, 139 -.
- 105.- H. Wagner, U. Knaus y E. Jordan (1987). Pflanzeninhaltsstoffe mit Wirkung auf das Komplement-system. *Zeitschrift furr Phytotherapie* 8, 148 -.



- 106.- H. Wagner y A. Proksch (1987). Structural analysis of a 4-o-methylglucoronoarabinoxylan with immunostimulating activity from *Echinacea purpurea*. *Phytochemistry* 26, 1989 -.
- 107.- H. Wagner y H. Reger (1987). Radix Primulae-Extrakte, HPLC-Analyse. *Deutsche Apotheker Zeitung* 126, 2631 -.
- 108.- H. Wagner, M. Wierer y B. Fessler (1987). Effects of garlic constituents on arachidonate metabolism. *Planta Medica* 55, 305 -.
- 109.- H. Wagner y E. Jordan (1988). An immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* berries. *Phytochemistry* 27, 2511 -.
- 110.- H. Wagner, B. Kreher y K. Jurcic (1988). "In vitro" stimulation of human granulocytes and lymphocytes by pico- and fentogram quantities of cytostatic agents. *Arzneimittelforschung/ Drug Research* 38, 276 -.
- 111.- H. Wagner, H. Stuppner, W. Schafer y M. Zenk (1988). Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. *Phytochemistry* 27, 119 -.

112.- H. Wagner (1989). Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. *Planta Medica* 55, 235 -.

113.- H. Wagner, W. Breu, F. Willer, M. Wierer, P. Reminger y G. Schwenker (1989). "In vitro" inhibition of arachidonate metabolism by some alkamides and alkytated phenols. *Planta Medica* 55, 556 -.

114.- H. Wagner (1990). Search for plant derived natural products with immunostimulating activity (recent advances). *Pure and Applied Chemistry* 62, 1217 -.

115.- H. Wagner (1993). Leading structures of plant origin for drug development. *Journal of Ethnopharmacology* 38, 105 -.

116.- D.M. Weir (1983). *Handbook of Experimental Immunology*, Volumen II, Oxford, Inglaterra.

117.- P.C. Wilkinson (1981). Neutrophil function test. En: *Techniques in Clinical Immunology*. R.A. Thompson (Ed), Blackwell Scientific Publications USA, página 273.

118.- S.M. Wong, S. Antus, A. Gottsegen, B. Fessler, G.S. Rao, Sonnenbichler y H. Wagner (1988). Wedeloactone and coumestan

derivatives as new antihepatotoxic and antiphlogistic principles. *Arzneimittel Frschung/Drug Research* 38, 661 -.

119.- L.N. Xu, R. Ouyang, Z.Z. Yin, L.Y. Zhang y L.X. Xi (1981). Effect of Dang Gui (*Angelica sinensis*) and its constituent ferulic acid on phagocytosis in mice. *Chemical Abstracts* 97, 16815.

120.- H. Yamada y H. Kiyohara (1989). Anticomplement active polysaccharides. En: H.M. Chang (Ed), *Abstracts of Chinese Medicine (ACME)*. The chinese University of Hong Kong, N.T. Shatin Vol 3, N°1.