Tesis de Posgrado



Efectos inmunomoduladores del extracto acuoso de hojas de Trichilia Glabra

Benencia, Fabián

1996

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Benencia, Fabián. (1996). Efectos inmunomoduladores del extracto acuoso de hojas de Trichilia Glabra. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2821_Benencia.pdf

Cita tipo Chicago:

Benencia, Fabián. "Efectos inmunomoduladores del extracto acuoso de hojas de Trichilia Glabra". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2821_Benencia.pdf





Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EFECTOS INMUNOMODULADORES DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA

FABIAN BENENCIA

Director de tesis: FELIX CARLOS COULOMBIE

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología

Departamento de Química Biológica

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenso Aires

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires Efecto inmunomoduladora del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra

Resumen

En este trabajo se estudió la actividad inmunomoduladora extractos acuosos de hojas de la meliácea autóctona Trichilia glabra sobre distintos componentes del sistema del Inmune ratón albino cepa Balb/c. Actividades inmunosupresoras "in vitro" se detectaron sobre la capacidad fagocítica y el metabolismo oxidativo de macrófagos y PMN, y sobre la proliferación de células linfoides inducidas por mitógenos. También se detectó una importante actividad inhibitoria de la capacidad hemolítica del complemento. La administración del extracto a los animales indujo una disminución en las respuestas de inflamación inmediata, hipersensibilidad retardada y en la producción de anticuerpos hemaglutinantes. investigación bioquímica La actividades biológicas involucradas determinó que los antimitogénico y principios activos antifagocítico son moléculas de pequeño tamaño, mientras que polisacáridos neutros son responsables de la actividad anticomplementaria.

Palabras clave: Inmunomodulador/ *Trichilia glabra*/ extracto acuoso/ ratón/ antifagocítico/ anticomplementario.

Immunomodulatory effects of *Trichilia glabra* leaf aqueous extract

Abstract

In this work the immunomodulatory activity of Trichilia glabra leaf aqueous extractos over different components of the white mice inmune system was studied. Immunosupressive activities over the phagocytic capability and oxidative burst and PMN, mitogen macrophages and over induced proliferation of lymphocytes were detected "in vitro". An the hemolytic capability important inhibition of Immediate inflammation and complement was also reported. delayed hypersensitivity responses as well as haemaglutinant antibodies production was impaired in animals treated with the extract. Biochemical investigations determined that the antiphagocytic and antimitogenic active principles were small molecules while neutral polysaccharides were responsible for the anticomplementary activity.

Key words: Immunomodulator/ **Trichilia glabra**/ aqueous extract/ mouse/ antiphagocytic/ anticomplementary.

A la Lic. Gloria L. Tagliani, quien mientras yo sea (al fin y al cabo uno es su memoria) no caerá en el Todo-nada.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felix Carlos Coulombíe por la libertad con que me permitió llevar a cabo mi trabajo y por la minuciosa revisión de este manuscrito. Y por haberme enseñado el valor del pragmatismo.

A la Dra. Celia Esther Coto por haberme ofrecido trabajar en el laboratorio.

A la señora Angélica Pizarro, a su esposo Juan y al resto de su familia por la amabilidad que siempre me han dispensado.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a aquellas personas que a lo largo de estos años me han acompañado consiguiendo el pequeño milagro de hacer esta vida un poco más llevadera.

A Cecilia, sin cuya ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

A Luis Alberto Scolaro por su amistad.

A Viviana, Gaby y sus hijos, una familia como la que uno quisiera construir.

A Soledad Villamil y Andrea Barquero.

A Nelly Candurra, Elsa Damonte, Ernesto Massouh y Carlos Pujol e Isabel Paz.

A Marina Bellani y Adriana Cucchi.

A Guillermo y Elizabeth.

A Mariana Nores, Bessie Craig y Nancy Ribas.

A Carlos Lemos y Adriana Descalzo.

A Hernán Cavalieri, Ariel Silber y Sebastián Reynaldi.

A Silvia Coronato porque la quiero mucho.

A Laura Alché, la persona con más entereza que conozco y de quien puedo decir que cualquiera se sentiría muy orgulloso de tenerla a su lado.

MENCIONES ESPECIALES

En este apartado quiero recordar afectuosamente

numerosas personas con las que he convivido a lo largo de estos

años:

Laura Maskin, Dra. Susana Mersich, Mónica Wachsman, Laura

Raiger-Iustman y Patricia Gadaleta.

La gente de los Laboratorios de Genética Bacteriana y

Microbiología: Dra. Beatriz Méndez, Gustavo Vásquez, Julia

Pettinari, Nancy Lopez, Mirta Floccari, Dra. Carmen Sánchez

Rivas, Sandra Ruzal y Alejandro Alice.

Rubén, Caty, Hebe, Fernanda y en especial a Juan Flo, el

mejor docente que conozco.

Juan Claus, Noemí Steyerthal, Mónica Córdoba, Diana Vullo,

Teresa Kim y Lilian Montero.

Recuerdo imborrable: Mirta Perelmuter.

INDICE

INTRODUCCION
Etnofarmacología2
Medicina natural e inmunomodulación11
Inmunomoduladores13
Inmunomoduladores de origen vegetal15
Efecto de distintas sustancias de origen vegetal sobre algunos componentes del sistema inmune19
Efectos sobre células fagocíticas
La familia meliaceae y el sistema inmune39
OBJETIVOS46
MATERIALES Y METODOS48
1. Animales49
2. Complemento49
3. Células
3.2.1. Macrófagos residentes y no residentes

4	4. Virus
	4.2. Titulación del stock viral54
Ç	5. Material vegetal55 5.1. Recolección del material vegetal55
	5.2. Preparación del extracto
(5. Ensayos in vitro
	6.1. Ensayo de actividad hemolítica del complemento56
	6.2. Determinación del efecto del extracto sobre la capacidad fagocítica de los
	macrófagos peritoneales murinos58
	6.2.1. Opsonización de GRC58
	6.2.2. Ensayo de opsonoeritrofagocitosis58
	6.2.3. Reversibilidad del efecto del extracto
	sobre la capacidad fagocítica60
	6.2.4. Cinética de establecimiento del efecto
	inhibitorio del extracto sobre la
	capacidad fagocítica de macrófagos
	murinos60
	6.2.5. Efecto del extracto sobre la
	fagocitosis de partículas de sílica61 6.2.6. Efecto del extracto sobre la
	formación de rosetas62
	6.2.7. Determinación del efecto del extracto
	sobre la producción de radicales libres62
	6.2.7.1. Opsonización de zimosán
	6.2.7.2. Ensayo de reducción del azul de
	tetrazolio (NBT)63
	6.2.8. Efecto del extracto sobre el consumo de
	glucosa de macrófagos peritoneales64
	6.2.9. Efecto del extracto sobre la infección
	de macrófagos peritoneales murinos con
	virus Herpes simplex tipo I65
	6.2.10. Efecto del extracto acuoso de hojas de
	Trichilia glabra sobre la expresión de
	distintas moléculas en la membrana de
	macrófagos peritoneales murinos66
	6.2.11. Efecto del extracto sobre PMN murinos67
	6.3. Determinación del efecto del extracto
	sobre los linfocitos
	6.3.1. Ensayo de incorporación de (³ H) Timidina68
	6.3.2. Efecto del extracto sobre la producción
	de interferón Gamma (IFN)68
	6.3.2.1. Inducción de IFN gamma
	6.3.2.2. Titulación de IFN gamma

7	7.	Ensayos in vivo	.70 .70
	7.	2. Actividad anticomplementaria in vivo	.70
		del extracto acuoso sobre la actividad hemolítica del suero de ratones tratados	.71
	7.	 Cinética del efecto anticomplementaria observado en el suero de animales 	
	7.	tratados	
	7.	sobre la respuesta inmune humoral	
	7.	3.2. Titulación de anticuerpos hemaglutinantes séricos de ratón	
	7.	4. Determinación del efecto del extracto sobre la respuesta inmune celular	
	7.	4.1. Reacción de injerto contra huésped	.73
		4.3. Efecto del extracto sobre la respuesta de inflamación inmediata	.76
		4.4. Fagocitosis in vivo	
	•	Andrists estadistico	. / 0
		Caracterisación bioquímica de las estividades	
		Caracterización bioquímica de las actividades presentes en los extractos acuosos de <i>T.glabra</i>	
9	9.	presentes en los extractos acuosos de <i>T.glabra</i> 1. Técnicas básicas	.78 .78
9	9. 9.	presentes en los extractos acuosos de <i>T.glabra</i> 1. Técnicas básicas	.78 .78 .78
9	• 9. 9.	presentes en los extractos acuosos de <i>T.glabra</i> 1. Técnicas básicas	.78 .78 .78
9	9. 9.	presentes en los extractos acuosos de <i>T.glabra</i> 1. Técnicas básicas	.78 .78 .78 .79
9	9. 9. 9.	presentes en los extractos acuosos de <i>T.glabra</i> 1. Técnicas básicas	.78 .78 .79 .79
9	· 9999999999	presentes en los extractos acuosos de T.glabra 1. Técnicas básicas	.78 .78 .79 .79 .79
9	· 9999 999	presentes en los extractos acuosos de T.glabra 1. Técnicas básicas	.78 .78 .79 .79 .79
9	· 99999 999 9	presentes en los extractos acuosos de T.glabra 1. Técnicas básicas	.78 .78 .79 .79 .79
9	· 99999 999 99	presentes en los extractos acuosos de T.glabra 1. Técnicas básicas	.78 .78 .78 .79 .79 .80 .81
9	· 9999 999 999	presentes en los extractos acuosos de T.glabra 1. Técnicas básicas	.78 .78 .78 .79 .79 .80 .81 .81
9	· 99999 999 999 9	presentes en los extractos acuosos de T.glabra	.78 .78 .79 .79 .79 .80 .81 .82

1 ^	A 17	L .	: :	1	1	1											
10.	2. Ex	xtrac ri <i>c</i> h:	ccion ilia	n de σlai	las b ra	con	ojas n di:	sec stir	cas ntos	ae s sc	lve	ente	es.				83
10.	3. Pi	urif:	icaci	ón d	de 1	a a	cti	vida	ad								
	aı	ntic	omple	ement	cari	a									• •		84
10.	3.1.	Obte	encić	on de	e un	a f	rac	ciór	ı cr	ruda	ı de	•					
		boT:	isacá	irido)s	• • •	• • •	• • • •	• • • •	• • •	• • •	• • •	• • •	• • •	• •	• • •	84
10.	3.2.	Cro	natog oatch	rai:	La d	le 1	inte:	rcan	MD10) 10	onic	0					85
1.0	3.3.	en r	Jacch	1 (DE	: ~ ~	Ser	niau	ex r	1-2-	// · ·		, , , ,	· · ·	• • •	• •	• •	0 5
10.	3.3.	CIOI	colum	nna (ום ט	le i	aro	ca Ci	PR	IIIO I		ша					86
10	3.3.	1 611	olihr	cació	in d	ا ما	a C	מונו ב	nna	• • • •	•••	• • •	• • •	• • •	••	• •	
10.	J.J.		e Sep														87
10	3.3.2	2 D	oterm	ninac	rión	de.	ol n	eso	mol	eci	ılaı	-					87
	4. Pi																
10.			imito														
	me	etano	ólica					`									88
10.	4.1.	Pari	tició	on de	e la	fr	acc	ión	met	anć	olio	ca e	en	un	•	•	
			tema														
		de e	etilo	\mathbf{v}	agua												88
10.	4.2.	Cro	natoo	raf	ía e	n c	colu	mna	de	Sil	lica	age.	1 6	o			88
	4.3.																
	4.4.																
				,		1			- 5								
RESU	LTAD	os															91
Part	e I:		cto d								:o"	CO	n				
Part	e I:	el e	extra	acto	acu	osc	de	hoj	jas	de							
Part	e I:	el e Tri	extra chili	acto ia g.	acu lab i	osc a s	de sobr	hoj e di	jas isti	de nto	s	comj	pon				
Part	e I:	el e Tri	extra	acto ia g.	acu lab i	osc a s	de sobr	hoj e di	jas isti	de nto	s	comj	pon				92
		el e Trid del	extra <i>chili</i> sist	acto i a g . :ema	acu labr inm	iosc :a s iune	o de sobre e de	hoj e di l ra	jas isti atór	de into	s	comj	pon				92
1. A	.ctiv:	el e <i>Trid</i> del	extra chili sist sobr	acto ia g. :ema	acu labr inm	osc a s une	o de sobre de Leme	hoj e di l ra	jas isti atór del	de into	s o	comp	pon ···	• • •	• •	• •	
1. A		el e <i>Trid</i> del	extra chili sist sobr	acto ia g. :ema	acu labr inm	osc a s une	o de sobre de Leme	hoj e di l ra	jas isti atór del	de into	s o	comp	pon ···	• • •	• •	• •	
1. A a	ctiv: cuos	el e Tridel del idad o de	extra chili sist sobr hoja	acto ia g. iema re el as de	acu labr inm l co	osc a s une mpl	o de sobre de de Lemen	hoje di l ra nto a g i	jas isti atór del labı	de nto n ex	os o	comp	pon ···	• • •	• •	• •	
1. A a 2. E	ctiv: cuoso fecto	el e Tridel idad o de	extra chili sist sobr hoja l ext	acto ia g. cema ce el as de	acu labr inm l co e Tr	osc a s une mpl ich	de sobre de de lemen	hoje di l ra nto a g i de h	jas isti atór del labu	de into ex ca	os d ktra	comp	pon ···	•••	• •	• •	
1. A a 2. E	ctiv: cuoso fecto rich :	el e Trid del idad o de o del	extra chili sist sobr hoja l ext glab	acto ia g. cema ce el as de cract	acu labr inm l co E Tr	osciune ompl	de de de de lemen lemen lemen la ac	hoje di l ra nto a g i de h	jas isti atór del labu noja vida	de into ex ca	os d atra	comj acto	pon o 	•••	•••	• • •	92
1. A a 2. E T d	ctiva cuoso fecto rich a e los	el e Tridel idad o de o dei ilia s mad	extra chili sist sobr hoja l ext glab crófa	acto ia g. tema te el as de tract ora s agos	acu labr inm l co e Tr to a sobr	oscientes de la cuca d	de d	hoge di l ra nto a gi de h ctiv	jas isti atór del labr noja vida mur	de nto	tra tra	comj acto	pon o 	•••	•••	• • •	92
1. A a 2. E T d	ctivi cuoso fecto rich e los . To	el e Trie del idad o de ilia s mac	extra chili sist sobr hoja l ext glab crófa dad d	acto ia g. tema te el as de tract ora s agos del e	acu labr inm l co e Tr to a sobr per extr	osciente de la cucha cuc	de d	hoge di l ra nto a gi de l ctiv les cuos	jas isti atór del labu noja wida mur so c	de nto	tra de oiol	com	pon o 	•••	•••	• • •	92
1. A a 2. E T d	ctivicuoso fecto fecto rich: e los . Too de	el e Trie del idad o de ilia s mac kicio	extra chili sist sobr hoja l ext glat crófa dad d chili	ia g. cema ce el cract cract cract cract cract cract cract	acu labr inm l co e Tr to a sobr per extr labr	mpl icuc e l itc	de de sobre de lemer de la lem	hote di l ra nto a g i de l ctiv les cuos	jas isti atór del labi noja vida mur so c s ma	de into ex- as co inc de h	tra de oiol os.	com acto lóg: as	pon ica	• • •	•••	• • •	92 95
1. A a 2. E T d 2.1	ctivicuoso fecto rich e los de	el e Trie del idad o de ilia s mac cicio Trie	extra chili sist sobr hoja l ext glab crófa dad d chili neale	ia g. cema ce el cract c	acu labr inm l co e Tr to a sobr per extr labr urin	mpl cuc e l itc	de d	hote di l ra nto a gi de l ctiv les cuos	jas isti atór del labi noja vida mur so co	de into	tra de oiol os	com acto lóg: as	pon ica	• • •	•••	• • •	92 95
1. A a 2. E T d 2.1	ctivicuoso fecto rich e los de per	el e del idad o de cilia s maccicio Tricorecto	extra chili sist sobr hoja l ext glab crófa dad d chili neale del	ia g. cema ce el cract c	acu labr inm l co rector co a sobr per extr labr urin cact	omplication in the control of the co	de d	hose di l ra nto a ga de l ctiv les cuos s	jas isti atór del labi noja wida mur so ca s ma	de into as o ind h rinc de h incré	tra tra le oiol os.	comj acto	pon ica	• • •	• •		92
1. A a 2. E T d 2.1	ctivicuoso fecto rich e los de per Efe	el e Trie del del de	extra chili sist sobr hoja l ext glab crófa dad d chili neale del chili	ia g. ce el cract	aculabring acut acut acut acut acut acut acut acut	mpl icuc e l iact act act	de d	hore did not on to a graduation of the school of the schoo	jas isti atór del labu noja wida mun so ca so ma	de into into inc inc inc inc inc inc inc inc	tra de oioja ofaç	comp	pon ica	····	 	ca	92 95
1. A a 2. E T d 2.1	ctivicuoso fecto rich e los de per de de de	el e Trie del idad o de ilia s mac ritor ecto mac ritor	extra chili sist sobr hoja l ext glab crófa dad d chili neale chili rófag	ia g. ce el cract	acu labr inm l co sobr per extr labr labr labr co labr	mplacion se la cuo con a c	de d	hote did nto a graduation de hote cuos constants constan	jas isti atór del labi noja wida muri so ca na ca nuri	de into	ctra ctra de piol pos	composition of the composition o	pon ica fag		 	ca	92 95
1. A a 2. E T d 2.1	ctivicuoso fecto rich e los de per de de de c. Rev	el e del del de	sist sobr hoja l ext glab crófa dad d chili neale chili rófag ibili	ce elemante de ele	acu labr inm l co e Tr to a sobr per extr labr labr del	mplantich cucce literatura processor as torner ef	de de sobre de lementalia de la compansa de la comp	hose di nto a gi de h ctiv les cuos los e la es m	jas isti atór del labu noja vida muri so ma ca nuri el e	de into	de oiol	Lóg:	pon ica fag	 oci	 	Ca	92 95
1. A a 2. E T d 2.1	ctivicuoso fecto rich e los de per de de de de de de	el e del del de	sist sobre hoja lext glabor del chili rófagibili as de	ce electoria generales de cora se extra generales municia generales municipales muni	acu labr inm l co e Tr to a sobr extr labr labr celichi	mplantich cucce literatura processor set on a storm of the cucce of th	de sobre de lementation de la actionation de la cubication de la cubicatio	hote did nto a gi de la ctiva los cuos con ce la ce con ce	jas jasti atór del labi noja vida muri so ma de ca muri el so	de into	de d	Lóg:	pon ica fag acu	ocí		ca	92 95 95
1. A a 2. E T d 2.1 2.2 2.3	ctivicuoso fecto rich e los de per de de de de de de	el e Trie del idad o de ilia s maci cicio Trie macri vers: hoja los	sist sobre hoja lext glab crófad de chili rófagibili as de macr	ce electoria de craciona de craciona de cora d	inm l co e Tr to a sobr extr labr cact delichi	mplantich cucce literatura per ef. lia	de de sobre de lementation de la actoria de la cuoria del cuoria de la cuoria del la cuoria del la cuoria della de	hose did not on to a graduative de la compansion de la co	jas	de into	tractical design of the control of t	Lóg:	pon ica fag acu	ocí		ca	92 95 95
1. A a 2. E T d 2.1 2.2 2.3	fectorich: e los de per de de Rev de de c. Cir	el e Trie del idad o de ilia s maci cicio Trie macri vers: hoja los nétic	extra chili sist sobr hoja l ext crófad dad d chili neale chili rófag ibili as de macr ca de	tema general se esta general se extractional s	inm l co e Tr cobr per labr labr del ichi gos tabl	mplich cucle literature efficient per eci	de de sobre de de le mei la conea co	hote did not on to a grade in to consider a la considera in to consider a la considera in to consider a la considera in to considera in the consideration in the consideratio	jas	de into	os contractor de la con	Lóg:	pon ica fag acu ago	ocí		ca	92 95 95
1. A a 2. E T d 2.1 2.2 2.3	fectorich: e los de per de de Rev de de c Cin ant	el e Trie del idad o de ilia s maccion Trie macri hoja los nética Trie trie trie trie trie trie trie trie t	extra chili sist sobr hoja l ext crófad deli rófag ibili as de gocít chili	ia g. cema ce elas de craci cora s agos del e extra cofa ce est cia g.	inm l co cobr cobr cobr extr labricact labricact delichi gos tabl	mplich cucle it can be a second as the case of the cas	de de sobre de de le mei de le	hote did not on to a grant of the school of	jas	de into	ctra ttra ttra ttra ttra tora	Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg:	pon ica fag acu ago	ocí	ti	ca	95 95
1. A a 2. E T d 2.1 2.2 2.3	fectorich: e los de per de de Rev de de c Cin ant	el e Trie del idad o de ilia s maccion Trie macri hoja los nética Trie trie trie trie trie trie trie trie t	extra chili sist sobr hoja l ext crófad dad d chili neale chili rófag ibili as de macr ca de	ia g. cema ce elas de craci cora s agos del e extra cofa ce est cia g.	inm l co cobr cobr cobr extr labricact labricact delichi gos tabl	mplich cucle it can be a second as the case of the cas	de de sobre de de le mei de le	hote did not on to a grant of the school of	jas	de into	ctra ttra ttra ttra ttra tora	Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg: Lóg:	pon ica fag acu ago	ocí	ti	ca	95 95

2.5. Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la fagocitosis
de sílica por macrófagos peritoneales murinos102 2.6. Efecto del extracto acuoso de hojas
de Trichilia glabra sobre la formación de rosetas en macrófagos
peritoneales murinos
de macrófagos peritoneales murinos
Trichilia glabra sobre el consumo de glucosa de macrófagos peritoneales murinos
2.9. Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la replicación de
HSV-I en macrófagos peritoneales murinos115 2.10. Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la expresión de
moléculas en la membrana de macrófagos peritoneales murinos117
3. Efecto del extracto acuoso de hojas de <i>Trichilia glabra</i> sobre la capacidad fagocítica y el metabolismo oxidativo de PMN
4. Efecto del extracto de <i>Trichilia glabra</i> sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos
sobre los linfocitos murinos

d	fecto del tratamiento con el extracto acuoso e hojas de <i>Trichilia glabra</i> sobre la producción e anticuerpos hemaglutinantes
d.	fecto del tratamiento con el extracto acuoso e <i>Trichilia glabra</i> sobre la respuesta de nflamación inmediata143
a: m:	fecto del tratamiento con el extracto cuoso de <i>Trichilia glabra</i> sobre algunos spectos de la respuesta inmune celular ediados por células T
6.2.	Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de <i>Trichilia glabra</i> sobre la reacción de injerto contra huésped150
Part	e III: Caracterización bioquímica de las actividades presentes en el extracto acuoso de <i>Trichilia glabra</i> 152
1. C	aracterísticas del extracto crudo152
do y ex 2.1 2.2 2.3 2.4 2.5	nsayos realizados para la caracterización e los principios activos antifagocítico anticomplementarios presentes en el stracto acuoso de <i>Trichilia glabra</i>
Part	e IV: Purificación de los principios activos presentes en hojas verdes de <i>Trichilia glabra</i> 169
1. E	xtracción del material vegetal on distintos solventes
	urificación del principio ctivo anticomplementario172

2.1.	Cromatografía de intercambio iónico	
	en batch (DEAE-Sephadex A-25)174	
2.2.	Cromatografía de filtración molecular en	
	columna de Sepharosa 2B	
2.3.	Evaluación de la marcha de purificación	
	del principio activo anticomplementario178	
	rificación de los principios activos	
	tifagocítico y antimitogénico180	
3.1.	Partición de la fracción metanólica	
	en un sistema bifásico constituído	
	por acetato de etilo y agua180	
3.2.	Cromatografía de adsorción en	
	columna de Sílicagel 60 H183	
3.3.	Cromatografía en columna	
	de Sephadex LH-20185	
3.4.	Cromatografía en capa delgada188	
DICCII	SION192	
DISCOS	51UIN	
BIBLIC	OGRAFIA223	

INTRODUCCION

ETNOFARMACOLOGIA

El uso de plantas para curar es tan antiguo como el hombre, y éstas juegan todavía hoy un papel muy importante en los países subdesarrollados. La OMS ha estimado que alrededor del 80% de los más de 4000 millones de habitantes del mundo dependen principalmente de medicinas tradicionales para sus necesidades primarias básicas y la mayor parte de las terapias tradicionales involucra el uso de plantas medicinales y sus principios activos. Curiosamente, la mayoría de estas plantas no ha sido aún estudiada científicamente (16, 29, 55).

Durante los últimos cien años los países industrializados han reducido gradualmente el uso de plantas medicinales. Hasta el siglo pasado dichas plantas eran utilizadas únicamente en forma de extractos crudos pero se inició una nueva época cuando por primera vez se aisló la morfina del opio. Desde entonces, la investigación se volvió principalmente orientada hacia los aspectos químicos y la manufactura de compuestos puros extraídos de plantas medicinales (como estricnina, cafeína, quinina, etc.).

El mejoramiento de las posibilidades de síntesis de sustancias deseables determinó que la búsqueda de remedios en el reino vegetal disminuyera. Este estado de cosas siguió hasta 1957, año del descubrimiento de potentes sustancias bioactivas en extractos de *Catharanthus roseus*. En los últimos cuarenta años el descubrimiento de alcaloides oncolíticos en *C. roseus*

determinó no sólo la producción de cientos de reportes científicos sino que también ha estimulado la búsqueda de otros agentes bioactivos de origen vegetal. Actualmente, cerca de 6000 muestras de plantas por año son recolectadas y estudiadas en el National Cancer Institute de EEUU (16, 55).

Así surge el término etnofarmacología, el cual propuesto para reflejar el enfoque etnológico de la exploración científica de productos utilizados en la medicina natural. De este modo, la etnofarmacología involucra la observación, identificación, descripción e investigación experimental de los ingredientes y los efectos de preparaciones medicinales indígenas. Este es un campo altamente interdisciplinario que implica la colaboración cercana entre farmacólogos, etnólogos, botánicos y químicos (29, 175).

Existen distintas razones para estudiar los usos medicinales de plantas por parte de culturas indígenas: primer lugar, la utilización de la información etnológica como guía para el desarrollo de nuevas drogas resulta sumamente útil. Esto parte de asumir que las plantas que han sido usadas por culturas indígenas durante un largo período de tiempo serán plantas donde potencialmente existan drogas de interés. Esto permite reducir el tiempo y los altos costos que involucra el desarrollo de drogas sintéticas. Se ha estimado que, en EEUU, para desarrollar una droga sintética desde su descubrimiento aprobación por parte de la Food and hasta la Administration (FDA) se requieren aproximadamente 12 años de trabajo con un costo promedio de 231 millones de dólares. Además, de cada 10.000 compuestos sintetizados y evaluados "in vitro" sólo 20 serán ensayados en animales, la mitad de ellos en humanos y uno sólo recibirá la aprobación de la FDA para ser distribuido en el mercado. De las 119 drogas derivadas de plantas que en 1993 se comercializaban en los EEUU el 74% fue descubierto como resultado de estudios químicos destinados a aislar el compuesto responsable del uso de la planta original en medicina tradicional. Estas drogas derivan de sólo 90 de las 250.000 especies conocidas de plantas con flor en el planeta (29, 133).

Por otro lado, contrariamente a lo que ocurre con las drogas químicas que se han incorporado recientemente en el mercado, las hierbas medicinales generalmente poseen una larga historia de uso tradicional, de modo que con ellas existe una considerable experiencia con respecto a su uso en la población. Esta experiencia informal es una herramienta poderosa, para la identificación de efectos adversos, que ocurren comunmente y se desarrollan inmediatamente después de empezada la terapia con drogas sintéticas. Puede cuestionarse que este empirismo no sea capaz de identificar efectos tóxicos poco conspicuos y que las retardadas reacciones У poco comunes no serán reconocidas. Un ejemplo es el de las hierbas medicinales conteniendo alcaloides pirrolizidínicos las cuales han sido utilizados desde tiempos prehistóricos. El primer caso de hepatotoxicidad neonatal asociado a la utilización de dicha droga durante el embarazo fue recién reportado en 1989 (45).

Según ciertos investigadores otra razón para estudiar los usos medicinales de plantas por culturas indígenas validar científicamente los efectos reportados las de preparaciones nativas. De este modo podría determinarse si estas preparaciones pueden ser recomendadas para usarse en aquellos países donde son culturalmente aceptadas y permitir a sus pobladores reducir los gastos de salud. Por lo tanto, existe una cuestión fundamental aún sin resolver respecto a las investigaciones sobre plantas utilizadas en la medicina natural: ¿es deseable esforzarse en aislar los compuestos puros fin de utilizarlos como drogas comercializables o preferible seguir utilizando las preparaciones tradicionales crudas? (54).

Una estrategia obvia para realizar una investigación etnofarmacológica es elegir una o más de las plantas usadas frecuentemente por una dada población o plantas que han sido usadas de forma similar por distintas poblaciones. Estas plantas constituyen un cuerpo de farmacopea botánica utilizada en el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades, algunas de las cuales estarían relacionadas por síntomas comunes, etiología, edad, etc. Desde un punto de vista antropológico, es lógico decodificar la complejidad de una farmacopea usando datos culturales para focalizar la investigación en algunas categorías de plantas seleccionadas.

Una submuestra podría incluir plantas utilizadas en múltiples contextos, por ejemplo medicina y dieta, medicina e higiene, medicina y cosméticos, etc. Las plantas utilizadas en más de un contexto potencialmente poseen un impacto en salud más significativo debido a que existe un gran número de individuos expuestos a los constituyentes farmacológicamente activos. Hasta hoy sólo un pequeño número de estudios ha explorado el uso multicontextual.

Otros estudios deberían focalizarse en aquellas plantas medicinales que han sido usadas repetitivamente en una determinada área geográfica.

Un cuarto ejemplo sería focalizar el estudio en aquellas plantas que aparecen en una larga cantidad de recetas que constituyen las terapias para tratar un determinado síntoma o grupos de síntomas, por ejemplo: cáncer, malaria, desordenes dentales o ginecológicos, etc. En este grupo de plantas se esperaría encontrar constituyentes con determinadas actividades farmacológicas, por ejemplo: antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos (52, 53).

Por lo tanto, una buena aproximación para el aislamiento de drogas con potencialidad medicinal es estudiar aquellas plantas con reputada actividad en medicina natural. Otras aproximaciones como por ejemplo los rastreos fitoquímicos o biológicos masivos de plantas seleccionadas al azar no han sido muy efectivos en el descubrimiento de nuevas drogas.

trabajo de campo en etnofarmacología requiere utilización de métodos botánicos, etnológicos y farmacológicos adecuados. Una demanda imperativa de todo estudio científico es que sea repetitivo, y uno de los mayores problemas en las investigaciones de plantas medicinales es que una segunda partida de material a veces da resultados discordantes comparados con los del primer análisis. Esto puede deberse a una variación entre un lote y otro en la cantidad de sustancias La concentración de drogas en las plantas consecuentemente su potencia bioactiva varían de acuerdo a la fuente y a la manipulación, la parte de la planta, la edad de la planta y factores ecológicos tales como plantas vecinas, estacionalidad, cambios diurnos de la luz, condiciones del suelo y clima. Además, el material seco suele no ser tan activo como el material fresco. Para obtener los mejores resultados del análisis químico de las plantas recolectadas es importante manejar el material apropiadamente, cuidando que dicho material no se mezcle con otro de apariencia similar, y recolectarlo en el momento adecuado del año. Las hojas deben recogerse cuando la planta está en flor, en tiempo claro, seco y en la mañana cuando el rocío se ha secado. Las flores deben colectarse inmediatamente después de abiertas, las semillas deben juntarse tan pronto emerjan. Los bulbos y las raíces deben recogerse las hojas de la planta están cayendo. Antes transportarlo, el material debe ser secado de modo de impedir

el ataque de los insectos, el crecimiento de hongos y para facilitar el transporte de material (102).

También puede ocurrir que una segunda muestra no sea bioactiva debido a que ha sido tomada de una especie distinta a la original. Hay que tener en cuenta que muchas veces el mismo nombre vernáculo es utilizado para distintas plantas, y que en ciertas ocasiones distintos nombres vernáculos son aplicados a la misma planta. Por lo tanto, en todo trabajo de campo es imprescindible identificar científicamente la especie recogida y guardar en forma cuidadosa una muestra para una posterior identificación en el laboratorio. Esas fallas pueden evitarse si se tiene colecciones documentadas de todos los especímenes de las plantas estudiadas (79).

Cada programa de rastreo de plantas abre la posibilidad de encontrar nuevos compuestos químicos con actividad biológica. Una vez que se ha aislado una actividad de interés, 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 como metas fundamentales mejorar la eficacia de la droga y reducir sus posibles efectos colaterales (173).

Existen dos factores que han impedido una mayor profundización de las investigaciones químicas tendientes a determinar la naturaleza de los principios activos presentes en las plantas medicinales. El primero de ellos es el hecho de que los científicos tienden a buscar compuestos que sean fácilmente

aislables y cristalizables. La alta proporción de alcaloides que figuran en las listas de principios activos de fuentes vegetales durante los últimos 150 años se debe probablemente a la habilidad de los mismos para disolverse en solventes polares y no polares de acuerdo a su pH, lo cual los hace sencillos de producir forma cristalina. E1aislar, purificar У en aislamiento de muchos otros principios activos de plantas involucra procesos mucho más complicados, lo que determina que trabajo fitoquímico en plantas que los contengan raramente comenzado o bien rápidamente abandonado.

En segundo lugar, una mención especial debe hacerse acerca de las técnicas biológicas cuantitativas. Un bioensayo adecuado debe ser desarrollado para monitorear el aislamiento de los constituyentes activos. Este ensayo debe permitir estimaciones rápido cuantitativas pero al mismo tiempo ser γ lo suficientemente sensitivo como para ensayar series de fracciones cromatográficas sin un gasto importante de material y de tiempo. Si una droga no produce un efecto farmacológico marcado que pueda ser medido en animales, probablemente no sea investigada científicamente. Esto implica que muchos remedios tradicionales que debieran ser estudiados son ignorados debido a la ausencia de técnicas adecuadas.

Dado que el rastreo de plantas utilizadas en medicina tradicional brinda una mayor cantidad de sustancias interesantes respecto al estudio de plantas escogidas al azar es obviamente importante documentar el conocimiento de los

encargados de ejercer las tareas curativas en las poblaciones primitivas, vulgarmente llamados curanderos o médicos brujos. Esto es una tarea urgente ya que debido al rápido proceso de aculturación de dichos pueblos, estos individuos podrían no encontrar sucesores. Esto implica que cuando mueren su conocimiento se pierde para siempre (77).

Hasta ahora la mayor parte de las drogas utilizadas en la clínica han sido obtenidas a partir de plantas no tropicales. Pero esto se debe simplemente al hecho de que los estudios fitoquímicos sobre las plantas fuera de los trópicos se han desarrollado durante mucho más tiempo. A pesar de ello, plantas tropicales han jugado un papel vital brindando algunas de las sustancias activas más importantes utilizadas actualmente medicina. La reserpina en (de Rauvolfia importante en el tratamiento de enfermedades serpentina), mentales, la G-strophantina (de Strophantus gratus) usada en casos de fallos cardíacos, la vincristina y la vinblastina (de Catharanthus roseus) son algunos de los más eficientes remedios contra ciertos tipos de cáncer.

Teniendo en cuenta que sólo el 15% de todas las plantas superiores han sido investigadas para metabolitos secundarios existe razón alguna para no suponer que un número no considerable de especies tropicales, no analizadas aún o incluso desconocidas por la ciencia, puedan contener sustancias iqualmente útiles a las mencionadas. Ejemplos recientes son la castanospermina del árbol australiano Castanospermun australe del cual se ha reportado que es de gran interés en la lucha contra el SIDA, y el Quil A., del árbol sudamericano *Quillaja* saponaria, que ha sido utilizado como adyuvante en la formulación de varios tipos de vacunas.

La situación respecto de las plantas medicinales en los trópicos es alarmante. La rápida destrucción de la vegetación tropical por la mano del hombre implica que los vastos recursos inherentes a las plantas medicinales estén desapareciendo rápidamente (78). Bajo esta situación, el conocimiento y la metodología botánica son necesarias para la conservación de plantas medicinales. Esto es muy importante para la etnofarmacología debido a que la amenaza a muchas especies usadas en medicina natural es grave, siendo muy probable que muchas de ellas se extingan en corto plazo de no revertirse esta tendencia.

MEDICINA NATURAL E INMUNOMODULACION

La función básica del sistema inmune es la defensa del organismo frente a las enfermedades. Este carácter "protector" del sistema inmune lo ubica en una posición clave entre el estado de salud y enfermedad de un huésped.

Las plantas constituyen una fuente de compuestos potencialmente activos sobre el sistema inmune. Preparaciones crudas obtenidas a partir 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 (74, 100).

La decisión de estudiar constituyentes de plantas modulen la respuesta inmune trae implicancias acerca de sí los conceptos de patogénesis y los métodos terapéuticos en los cuales se basa la medicina natural ofrecen una aproximación adecuada para la búsqueda de dicha actividad biológica. En las últimas décadas, los investigadores en etnofarmacología han debido reconocer que, incluso en grupos pequeños У superficialmente indiferenciados, existe una heterogeneidad considerable en cómo la gente percibe la enfermedad y organiza un tratamiento. Asimismo, se debe tener en cuenta que los términos sistema inmune o inmunomodulación no existen como tales en la medicina natural. Una estrategia para la búsqueda de plantas con actividad inmunomoduladora implica realizar una investigación sobre los tratamientos tradicionales aplicados a desórdenes y enfermedades que puedan asociarse razonablemente a disfunciones del sistema inmune. Esto abarca tratamientos relacionados con enfermedades de la piel, afecciones reumáticas o inflamatorias, infecciones, heridas, quemaduras y el empleo de preparaciones terapéuticas y tratamientos utilizados para revitalizar, fortalecer y estimular las funciones del cuerpo o prevenir enfermedades (101).

INMUNOMODULADORES

Se considera agente inmunomodulador a todo compuesto capaz de alterar alguna función del sistema inmune. Dentro de los inmunomoduladores encontramos agentes inmunosupresores inmunoestimuladores. Los primeros constituyen, en muchos casos, alternativa a quimioterapias convencionales una frente diversas enfermedades autoinmunes como es el caso de la artritis reumatoidea, la poliartritis, la miastemia gravis, la esclerosis múltiple y la psoriasis. Asimismo son útiles para el tratamiento de enfermedades que cursan con exacerbación de la funcionalidad del sistema inmune como es el caso de hepatitis crónica activa, enfermedad originada por infección con virus. También son de gran importancia cuando es necesario inhibir la actividad normal del sistema inmune como en el caso de la respuesta frente a injertos de tejidos u órganos.

Los inmunoestimuladores pueden utilizarse para el tratamiento de inmunodeficiencias secundarias. Por otro lado, han comenzado a aplicarse clínicamente a pacientes con cáncer ya que el crecimiento de tumores en ciertos casos puede ser inhibido estimulando a las células fagocíticas y a las células "natural killer".

La capacidad inmunomoduladora de un compuesto comúnmente se evalúa con una batería de ensayos (172). Un grupo importante de pruebas trata de determinar "in vitro" el efecto del compuesto sobre distintos componentes celulares y humorales del

sistema inmune como son los granulocitos, macrófagos, poblaciones de linfocitos T y B, células "natural killer" y complemento.

experimentos "in vitro" Cuando los revelan alguna actividad promisoria, ésta debe ser evaluada en modelos de inmunomodulación "in vivo" como por ejemplo 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 transplantes de distintos órganos ٧ 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.

Sin embargo, en muchos casos se ha descripto que una misma sustancia puede tener efectos inhibitorios al ser utilizada en altas concentraciones y actuar como inmunoestimuladora al ser administrada en muy bajas dosis. Por otro lado, una sustancia puede ejercer efectos estimuladores o inhibidores en función de condiciones experimentales tales como vía de inoculación, esquema de tratamiento, vehículo empleado o edad del huésped. El fenómeno de drogas que muestren efectos reversos dependiendo de la dosis no es nuevo, pero nunca ha sido implementado exitosamente en terapia. Esto ha determinado que a pesar de que se conozcan un gran número de compuestos capaces de modificar

la respuesta inmune, sólo unos pocos resulten verdaderamente efectivos cuando se los utiliza con fines clínicos.

INMUNOMODULADORES DE ORIGEN VEGETAL

La naturaleza química de las sustancias inmunomoduladoras aisladas de plantas medicinales es variada y, en general, suelen clasificarse en compuestos de bajo y alto peso molecular. Entre los primeros se encuentran principalmente alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos simples, mientras que en el segundo grupo encontramos proteínas y polisacáridos.

El término alcaloide fue propuesto por primera vez en 1819 por el farmaceútico Meissner y se aplica comúnmente compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas. naturaleza básica de todos estos compuestos se debe a presencia de nitrógeno amínico. Hasta la fecha, se conocen más de 400 alcaloides y se estima que están presentes solamente en un 10 a 15 % de todas las plantas vasculares conocidas. Debido a su complejidad estructural, su nomenclatura no ha sido sistematizada y suelen designarse según el género de la planta que los contiene y de la cual fueron aislados inicialmente (73). Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado alcaloides como pociones mágicas, venenos o medicamentos. En particular, distintos alcaloides han probado ser efectivos

inmunoestimuladores de granulocitos, macrófagos o linfocitos (171).

Los principios activos responsables de las fragancias de algunas plantas pueden ser extraídos como aceites volátiles por calentamiento o arrastre por vapor, por ello se los denominó aceites esenciales. Cuando se los investigó químicamente se encontró que en las fracciones más volátiles de dichos aceites había un gran número de hidrocarburos de fórmula C₁₀ H₁₆, a los que se denominó terpenos. Más tarde se aislaron compuestos oxigenados que también se incluyeron en la clasificación general por lo que la terminación "eno" resultó inadecuada y se los llamó terpenoides. Estos compuestos se utilizaron con fines medicinales para el tratamiento de distintas afecciones, como la artritis y el reumatismo. Estudios recientes han intentado determinar el mecanismo de acción de dichos compuestos. Actualmente se conoce que la actividad antiartrítica antiinflamatoria que presentan muchos terpenoides consecuencia directa de su efecto sobre el sistema inmune (75).

Entre los compuestos fenólicos simples son de singular importancia los fenilpropanos. Estos son sustancias aromáticas que tienen funciones oxigenadas (hidroxilos, metoxilos, metilendioxanos) en posiciones orto y/o para. Los fenilpropanos provienen del metabolismo de los hidratos de carbono. Desde el punto de vista biogenético son derivados del ácido shímico, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal, especialmente en las gimnospermas. Este ácido parece ser el

eslabón que vincula a los azúcares alifáticos con los derivados bencénicos de las plantas. Dentro de este grupo se encuentran, entre otros, los ácidos cinámicos, los lignanos, las cumarinas, las naftoquinonas y las antraquinonas. Muchos de estos compuestos presentan actividad inmunoestimuladora (160).

Finalmente, las saponinas y ciertos ácidos y lípidos de bajo peso molecular también presentan actividad sobre el sistema inmune.

Con respecto a compuestos inmunomoduladores de elevado peso molecular vale la pena mencionar que en los últimos veinte años un gran número de polisacáridos con actividad sobre el sistema inmune han sido aislados de plantas superiores. A este tipo de compuestos se les atribuye actividad sobre: la fagocitosis de granulocitos y macrófagos, la inducción de interferón, interleuquinas y factor de necrosis tumoral y la activación del 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 su actividad inmunomoduladora (160, 171).

Las lectinas son una serie de proteínas o glicoproteínas que se unen a 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 10.000 y 125.000 daltons. En general, contienen una o varias cadenas polipeptídicas, cada una de ellas con cientos de aminoácidos. Estos aminoácidos llevan como cadenas laterales varias docenas de residuos de azúcares, predominantemente manosas y glucosaminas acetiladas. El principal punto de unión de los residuos de azúcar es el ácido aspártico.

Un 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.

EFECTOS DE DISTINTAS SUSTANCIAS DE ORIGEN VEGETAL SOBRE ALGUNOS COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE

Efectos sobre células fagocíticas

El primer compuesto nitrogenado de origen vegetal que se identificó como inmunoestimulador fue el ácido aristolóquico (Fig. 1.1), un alcaloide aislado de Aristolochia clematitis. El efecto curativo de los extractos de esta planta, utilizada desde la antigüedad para el tratamiento de mordeduras de viboras y heridas infectadas, pudo explicarse como consecuencia de la estimulación del sistema inmune del huésped. Diversos experimentos demostraron que la capacidad fagocítica macrófagos peritoneales y polimorfonucleares murinos se ve 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 peritoneales del ratón (18). Desde entonces, se han identificado otros alcaloides activos sobre el sistema inmune. La mayoría de ellos estimula la actividad de las células fagocíticas. La isopteropodina (Fig. 1.2) aislada de la planta peruana Uncaria tomentosa, vulgarmente conocida como uña de gato, es capaz de estimular "in vitro" la fagocitosis de leucocitos polimorfonuclares a bajas concentraciones $(10^{-3} -$

 10^{-6} mg/ml) (159). Sin embargo, isómeros de este compuesto son inactivos, lo cual hace suponer una fuerte relación entre la estructura y la función. Es importante señalar que la mayoría los alcaloides aislados a partir de plantas exhiben altas concentraciones actividad inmunosupresora а inmunoestimuladora cuando las concentraciones empleadas son muy bajas. A modo de ejemplo se puede mencionar a la emetina (Fig. 1.3), 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 (161, 167).

La presencia de los terpenoides helenalina, (Fig. 1.4) dihidrohelenalina y ésteres derivados en extractos de hojas de plantas como Crysanthemun parthenium y especies de la familia Arnica explicaría las propiedades antiinflamatorias atribuidas a dichos extractos (75, 104). Estas sustancias fueron capaces de deprimir la respuesta inmune celular afectando a macrófagos y granulocitos (169). En este contexto, es interesante señalar que el 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Fig. 1.5) a concentraciones de 10^{-8} - 10^{-7} M, puede activar mecanismos citotóxicos macrófagos peritoneales de en ratón independientemente de la presencia de linfocitos (72). activación está acompañada por la liberación de peróxido de hidrógeno y de prostaglandinas. Por último, cabe acotar que un terpenoide glicosilado aislado de las raíces de Cynanchum caudatum es capaz de incrementar la actividad fagocítica de macrófagos murinos (160).

Entre los compuestos aromáticos o fenólicos de origen vegetal, se puede mencionar a la cleistantina (Fig. 1.6), un lignano derivado de Cleistanthus collinus, que es capaz aumentar el número de granulocitos circulantes cuando oralmente administrado a ratas, gatos y monos en dosis de 0,75 mg/kg (31). Otro grupo de compuestos aromáticos con actividad estimuladora de la fagocitosis está constituído por ubiquinonas. Según Block y col. (28), las ubiquinonas Q7 (Fig. 1.7) y Q_8 son capaces de incrementar significativamente la fagocitosis de macrófagos en concentraciones de 100 µg/ml. El test de "clearence" de carbón revela que la velocidad de desaparición de dichas partículas se incrementa al doble cuando los animales reciben una dosis de ·30 mg/kg. En animales tratados con ciclofosfamida, la ubiquinona Q7 induce secreción del factor estimulador de colonias e incrementa el número de granulocitos periféricos (160).

Por el contrario, la plumbagina (Fig. 1.8), naftoquinona obtenida de *Plumbago zeylanicum* ejerce un efecto inmunosupresor o citotóxico en 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 100 fg/ml (161, 167). Resultados similares se observan con otras naftoquinonas aisladas de vegetales como la chimafilina, la alcanina, la shikonina, la colchicina y la suramina (167).

ácido aristolóquico

(1)

helenalina

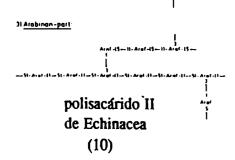
(4)

ubiquinona

(7)

II Arabimgalakinn-pari

21 Rhamnogalakturonen-part



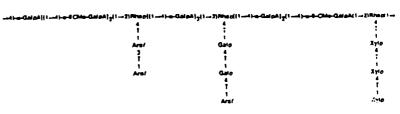
plumbagina

0

HO

(8)

polisacárido I de Echinacea (9)



polisacárido AS 4 de Achyroclina (11)

FIGURA 1

Xu y col. (178) 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 anis incrementa el número de leucocitos en sangre periférica (87). Numerosas catequinas y protocatequinas ácidas (161, 162) son capaces de producir una estimulación de granulocitos y un incremento del "clearance" de carbón.

Por otro lado, Lutomski y col. (160) reportaron que una mezcla químicamente no definida de saponinas de **Aralia** mundshurica es capaz de incrementar la fagocitosis y de inhibir el desarrollo de ciertos tumores como consecuencia de una estimulación del sistema inmune.

Entre los lípidos que pueden modular la respuesta inmune, la lisolecitina y algunos análogos sintéticos, los alquillisofosfolípidos merecen una mención especial. Modolell y col. (109) 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 de las sustancias de elevado peso molecular que afectan la actividad de los fagocitos se encuentran las lectinas y los polisacáridos. Así, lectinas específicas para fucosa pueden saturar los receptores para este azúcar en la membrana de los macrófagos y pueden inhibir la producción del factor inhibidor de la migración del macrófago (150).

Por otro lado, los polisacáridos que presentan mayor actividad sobre los macrófagos son predominantemente los xiloglucanos neutros, arabinogalactanos con ácido glucurónico o 4-0-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 (59).

Distintos polisacáridos químicamente definidos propiedades inmunestimuladoras han sido aislados a partir de Echinacea purpurea (105, 127). Entre ellos podemos mencionar: 35.000 heteroxilano molecular (peso D), un un arabinoramnogalactano ácido (peso molecular 450.000 D) fucogalactosilglucano (peso molecular 25.000 D) (Fig. 1.9 y 1.10). Todos ellos estimulan la fagocitosis de macrófagos y granulocitos y la producción de monoquinas, como interleuquina-1. Otros polisacáridos aislados y purificados a partir de la misma planta presentan actividades similares. Uno de ellos es arabinogalactano (peso molecular 75.000 D) un (168) que incrementa la citotoxicidad de macrófagos contra células tumorales y contra microorganismos tales como Leishmania enrietti y Candida albicans. Mas aún, este polisacárido induce "in vitro" a los macrófagos a producir factor de necrosis tumoral, interleuquina-1, interferón alfa y radicales libres que luego se pueden medir por quimioluminiscencia. 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.

Dos polisacáridos aislados de **Achyrocline satureioides** (Fig 1.11) conocida vulgarmente como Marcela, (glicanogalacturanos conteniendo ramnosa, xilosa y arabinosa) muestran una interesante actividad inmunoestimuladora sobre la fagocitosis de macrófagos y granulocitos (171).

Heteroglicanos ácidos extraídos de los rizomas de Curcuma longa (68, 69), Cnidium officinale (149) y de las semillas de Malva verticillata cuyo nombre vulgar (nv) es Malva (68) actividad fagocítica "in vivo" del estimulan la sistema reticuloendotelial de ratones tratados. Una actividad similar presentan ramnoarabinogalactanos extraídos de flores de Calendula officinalis (156) y de raíces de Glycyrrhiza uralensis (134, 182).

Efecto sobre los linfocitos

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

demostraron que el Abb col. (1) terpenoide 12-0tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Fig. 1.5) actúa como mitógeno y estimula la síntesis de ADN en linfocitos de primates. Por otro lado, Goldfarb y Herberman (65) observaron que los ésteres de forbol son capaces de inhibir la actividad de células "natural killer" de ratón y humanas. Algunas sesquiterpenlactonas como la tenulina, la helenalina y la eupaphisopina (Fig. 2.1; 1.4 y 2.2) presentan actividad antiartrítica "in vivo", obteniéndose los efectos más (50 - 70% de inhibición de un edema en rata) importantes cuando se emplean en concentraciones de 2,5 mg/kg. El efecto de estos compuestos parece darse en dos fases: primero incrementa la producción de anticuerpos y luego se inhibe la proliferación de linfocitos T.

El urushiol (Fig. 2.3) es un análogo del ácido araquidónico que se encuentra en baja concentración preparaciones obtenidas de hojas de plantas de Toxicodendron radicans. Este compuesto es utilizado para el tratamiento homeopático de enfermedades de la piel y es capaz de inducir "in vitro" la blastogénesis de linfocitos e "in vivo" reducir dermatitis alérgicas de contacto en cobayos (34).

Dentro de los compuestos con elevado peso molecular, las lectinas son compuestos muy importantes por su capacidad mitogénica sobre células del sistema inmune (103, 130). 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 Canavalia ensiformis y la fitohemaglutinina obtenida de Lens culinaris también ejercen efectos mitogénicos sobre los linfocitos (151). Se sospecha que las propiedades antiartríticas y citotóxicas de extractos de Phytolacca americana (planta de la familia del ombú) se deben a la presencia de lectinas en la preparación. La citotoxicidad de ciertas lectinas se debe en algunos casos a la inhibición de la síntesis intracelular de proteínas (131) y, en otros casos, es el resultado de la activación de células "killer". Las lectinas no han sido utilizadas en inmunoterapias aunque algunas se han empleado en diagnóstico médico debido a su actividad linfoaglutinante.

Kojima y col (96, 97) aislaron una proteína de raíz de **Artemisia princeps** por ultrafiltración y por cromatografía por Sephadex. Esta proteína tiene un peso molecular de $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ y es capaz de inducir la producción de interferón gamma cuando se administra por vía oral o parenteral.

Por otra parte, se ha reportado que el tratamiento de ratones con una dosis de distintas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPS) previa a una inmunización con glóbulos rojos de carnero o con polisacáridos bacterianos, disminuye significativamente la respuesta primaria de anticuerpos hacia dichos antígenos (17).

Por último, cabe mencionar que Muller y Franz han detectado arabinanos y arabinogalactanos con actividad mitogénica en flores de *Hibiscus sabdariffa* (112).

Efecto sobre el sistema complemento

El sistema complemento juega un rol prominente en la patofisiología de la artritis reumatoidea y en las enfermedades autoinmunes. Compuestos de bajo peso molecular como el ácido boswellico (Fig. 2.4) de Boswellia serrata, (planta de la familia del incienso) han resultado ser buenos inhibidores de la vía clásica del complemento (5). También la glicirrhizina, algunos ácidos fenolcarboxílicos como el ácido rosmarínico y los acilflavonolglicósidos poseen el mismo efecto (169, 163). Por otro lado, existen ácidos fenolcarboxílicos, alcaloides, isobutilamidas, quinonas y terpenoides con capacidad activadora del complemento. No se ha observado una relación directa entre estructura y función.

Entre las sustancias de elevado peso molecular que son capaces de activar al complemento se encuentran polisacáridos ácidos con estructura de poligalacturonanos y cadenas laterales de arabinogalactanos (166, 187, 189). Por otro lado, de distintas plantas se han aislado polisacáridos con actividad anticomplementaria sobre ambas vías del complemento. En general, se observa que la actividad anticomplementaria está asociada a heteroglicanos pécticos con alta proporción de

galacturonanos en el esqueleto. Sin embargo, hay polisacáridos neutros como la amilosa que aparecen en gran número de frutos y raíces y que son buenos agentes anticomplementarios (95). Entre polisacáridos con actividad anticomplementaria mencionar: pectinas de raíces de Bupleurum falcatum L. (188) Glycyrrhiza uralensis y Glycyrrhiza glabra (134, 141, 148, 182) de rizoma de Cnidium officinale (149) y de hojas de Artemisia princeps (190). Heteroglicanos ácidos de hojas de Artemisia princeps Pamp (190, 184), de hojas y raíces de Panax ginseng (nv: Ginseng) (62, 63) y de semillas de Coix lacryma-jobi (186). Mucilagos de hojas de Abelmoschus esculentus Moench, Hibiscus moscheutos L, Hibiscus syriacus L (146) y Malva sylvestris (145), y de semillas de Plantago asiatica (183). Polisacáridos neutros de semillas de Malva verticillata (68, 148, 147) y de anteras de Cervus nippon Temminck (192). Arabinogalactanos de raíz de Angelica acutiloba (157, 179, 180, 185).

En particular, dos polisacáridos aislados de Achyrocline satureioides (glicanogalacturanos conteniendo ramnosa, xilosa y arabinosa) ejercen una actividad anticomplementaria fuerte tanto por la vía clásica como por la vía alterna. Dicha actividad anticomplentaria es la responsable de la disminución en la respuesta inflamatoria medida por el modelo de edema de la pata del ratón (171). Polisacáridos ácidos obtenidos de plantas como Sabal serrulata, Viscum album (nv: muérdago europeo), Urtica dioica y Sedium telephium producen una marcada

inhibición de la vía clásica del complemento (187). Aquí también se observa correlación entre los efectos anticomplementarios "in vitro" y los efectos de inhibición de edema de la pata de rata (95, 164).

Efecto sobre mastocitos

El alcaloide cefarantina, aislado de Stephania cepharantha, es capaz 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 (160).

Los extractos acuosos de hojas de Tylophora indica y Tylophora asthmatica eran utilizados en medicina natural para el tratamiento del asma bronquial (113) y el reumatismo (37). Teniendo en cuenta estos datos, se iniciaron una serie de estudios que revelaron que los extractos ejercian efectos antianafilácticos, inducían leucopenia (69) У suprimían significativamente las respuestas inflamatorias agudas crónicas en modelos animales (70). Finalmente pudo establecerse que las actividades anteriores eran consecuencia de un efecto directo de los extractos sobre la liberación de histamina. La tiloforina (Fig. 2.5), alcaloide quimicamente relacionado con

el ácido aristolóquico, fue identificado como principio activo responsable de las actividades presentes en el extracto (76).

Efectos sobre enzimas relacionadas con procesos inflamatorios

Es generalmente aceptado que uno de los blancos principales de las drogas con actividad antiinflamatoria es el metabolismo de las prostaglandinas, especialmente las enzimas ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa. Estas enzimas intervienen en el metabolismo del ácido araquidónico generando a partir de éste: prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclinas (en el caso de la ciclooxigenasa) o leucotrienos y lipoxinas (en el caso de la lipooxigenasa). Estos compuestos intervienen en distintas inflamatorias afectando la dilatación reacciones de los capilaridad capilares, aumentando la vascular, activando plaquetas, actuando como agentes quimiotácticos de neutrófilos generando contracciones de la musculatura lisa microvasculatura de los pulmones entre otros efectos. Por lo tanto, resulta interesante la obtención de sustancias que actividad inhiban l a de estas enzimas. Los compuestos reportados que bloquean dicha actividad son principalmente de tres tipos:

- (a) Acidos fenolcarboxílicos, fenoles y sistemas conteniendo grupos fenólicos.
- (b) Análogos estructurales del ácido araquidónico.

(c) Estructuras que combinan sistemas aromáticos con cadenas insaturadas (alquilfenoles, retinoides).

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 (Salix chilensis) son inactivos cuando concentración es inferior a 250 µM, pero resultan ser efectivos antiinflamatorios "in vivo" luego de ser oxidados a ácido salicílico en el hígado (57). A partir de distintas especies de Primula ha aislado compuesto: el 4-metoxi-ácido se un salicílico-metil éster (Fig 2.6) que resulta más activo que la aspirina (164). Por otro lado, cabe mencionar que el ácido boswélico (Fig 2.5) es un buen inhibidor de la 5-lipooxigenasa (2, 4, 5).

Los aceites esenciales obtenidos a partir de distintas plantas, entre las cuales podemos mencionar a *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris* (nv: tomillo) o *Ledum palustre*, contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos como el eugenol (Fig. 2.7). 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.

Los cardanoles y cardoles de *Schinus therebinthifolius* y *Anacardium occidentale* muestran actividades antiinflamatorias variables dependiendo de la longitud y del grado de saturación de la cadena lateral (169).

El urushiol (Fig. 2.3) y algunos diarilheptanoides obtenidos de la familia Zingiberaceae tales como el gingerol (90, 91) inhiben tanto la ciclooxigenasa como la 5-lipooxigenasa cuando se los aplica en altas concentraciones.

En el grupo de los flavonoides y catequinas compuestos, como la galangina (Fig. 2.8) resultan buenos inhibidores de la ciclooxigenasa (137). Estos compuestos son efectivos cuando se los aplica como tópicos. En cambio, cuando se los administra por vía sistémica es muy difícil conseguir adecuados niveles en sangre ya que se metabolizan 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 oligogaloilglucosa (169). 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 У cumarinas con estructura de catecol como la wedelactona (Fig. 2.9) aislada de Eclipta alba y otros derivados de cumestrol resultaron activos inhibidores de la 5-lipooxigenasa (165, 177).

FIGURA 2

Es interesante señalar que ciertas amidas alifáticas como el spilantol (Fig. 2.10) de *Spilanthes oleracea*, el ácido dodecatetranoico-isobutilamida de *Echinacea purpurea* (Fig. 2.11) y el principio acre de la capsaicína (Fig. 2.12) de *Capsicum annium* han resultado inhibidores eficientes de la 5-lipooxigenasa (169, 170).

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 poliacetilenglicósidos 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 (19).

Los datos hasta aquí presentados se resumen en los Cuadros 1 al 5.

CUADRO I: Sustancias de origen vegetal que actúan sobre células fagocíticas

Especies descriptas	Efectoa	Compuestos conocidos
Achyrocline satureioides	(+)	Glicanogalacturanos
Aralia mundshurica	(+)	Extractos
Aristolochia clematitis	(+)	Ac.aristolóquico
Calendula officinalis	(+)	Ramnoarabinogalactanos
Cliestanthus collinus	(+)	Cleistanina
Cnidium officinale	(ት)	Heteroglicanos
Curcuma longa	(+)	Heteroglicanos
Crysanthemun parthenius	(-)	Helenanina y ésteres
_		derivados
Cynanchum caudatum	(+)	Extractos
Echinacea purpurea	(+)	Arabinoramnogalactano
	(+)	Fucogalactosilglucano
Glycyrrhiza uralensis	(+)	Ramnoarabinogalactanos
Malva verticillata	(+)	Heteroglicanos
Plumbago zeylanicum	(+/-)	Plumbagina
Uncaria tormentosa	(+)	Isopteropodina

CUADRO 2: Sustancias de origen vegetal que

Especies Efecto Compuestos conocidos

Artemisia princeps (+) Proteína
Canavalia ensiformis (+) Concanavalina A
Crysanthenum parthenius (+/-) Helenanina y ésteres derivados
Hibiscus sabdariffa (+) Arabinogalactanos
Lens culinaris (+) Fitohemaglutinina
Phaseolus vulgaris (+) Fitohemaglutinina
Phytolacca americana (+) Pokeweed
Toxicodendron radicans (+/-) Urushiol

CUADRO 3. Customaios de seisen mantel

CUADRO	3:	Sustancias	de origen vegetai
		que actúan	sobre mastocitos

Especies descriptas	Efecto ^a	Compuestos conocidos	
Stephania cepharata	(-)	Cefarantina	
Tylophora indica	(-)	Tiloforina	
T. asthmatica	(-)	Tiloforina	

a (-) = Supresor

CUADRO 4: Sustancias de origen vegetal que

actúan sobre complemento

Especies descriptas	Efecto ^a	Compuestos conocidos
Abelmoschus esculents	(–)	Mucílagos
Achyrocline satureioides	(–)	Glicanogalacturanos
Angelica acutiloba	(–)	Arabinogalactanos
Artemisia princeps	(–)	Heteroglicanos
Boswellia serrata	(–)	Acido Boswellico
Bupleurum falcatum	(-)	Pectinas
Cervus nippon	(–)	Polisacáridos neutros
Cnidium officinale	(–)	Heteroglicanos
Coix lacrima-jobi	(-)	Heteroglicanos
Glycyrrhiza glabra	(–)	Pectinas
G. uralensis	(–)	Glicirrhicina
Hibiscus moscheutos	(–)	Mucílagos
<i>H.syriacus</i>	(–)	Mucílagos
Malva sylvestris	(-)	Mucílagos
M.verticillata	(–)	Polisacáridos neutros
Panax ginseng	(-)	Heteroglicanos
Plantago asiatica	(-)	Mucílagos
Sabal serrulata	(–)	Polisacáridos ácidos
Sedium telephium	(-)	Polisacáridos ácidos
Urtica dioica	(–)	Polisacáridos ácidos
Viscum alba	(-)	Polisacáridos ácidos

a (-) = Supresor

CUADRO 5: Sustancias de origen vegetal que actúan sobre enzimas relacionadas con el fenómeno inflamatorio

Especies descriptas	Efecto ^a	Compuestos conocidos	
Anacardium occidentale Capsicum annium Eclipta alba Ledum palustre Schinus therebinthifolius Syzygium aromatica Spilanthes oleracea Toxicodendron radicans Thymus vulgaris	(-) (-) (-) (-) (-) (-) (-)	Cardanol Capsaína Wedelactona Eugenol Cardanol Eugenol Spilantol Urushiol Eugenol	

a (-) = Supresor

LA FAMILIA MELIACEAE Y EL SISTEMA INMUNE

Las meliáceas componen una familia de plantas utilizada ampliamente en medicina natural para el tratamiento de distintas enfermedades. Se ha reportado que extractos obtenidos a partir de hojas, corteza y semillas de distintos miembros de esta familia han sido utilizados exitosamente en el tratamiento de afecciones reumáticas e inflamatorias, tumores, infecciones microbianas, diversas parasitosis y ciertas enfermedades de la piel (11, 25, 26, 33, 35, 37, 40, 44, 60, 61, 113, 119).

Tal vez el representante más estudiado de esta familia sea Azadirachta indica, una planta utilizada durante siglos en la medicina natural de la India. Pillai y Santhakumari 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 (135). La nimbidina inhibió significativamente y de manera dependiente de la dosis, el edema inducido por carragenanos o por caolina (respuesta inflamatoria aguda), al igual que la artritis inducida por formaldehído (respuesta inflamatoria crónica). Okpanyi y col. (117) obtuvieron resultados similares luego de tratar ratas por vía oral con un extracto metanólico de hojas y corteza del mismo árbol. Por último, cabe destacar que Bhargava y col. demostraron que un limonoide obtenido a partir de la nimbidina, nimbinato de sodio, era responsable de la antiinflamatoria previamente mencionada (27). 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 (27, 117). Teniendo en cuenta que la nimbidina es utilizada como antihistamínico (123) y que es capaz de inhibir la prostaglandina sintetasa (116), 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.

Por otro lado, Fujiwara y col. (61) reportaron la inhibición del edema inducido por carragenanos en ratones después de la administración oral de polisacáridos obtenidos a partir de la corteza del mismo árbol.

También se determinó que diversos polisacáridos (6, 60) y limonoides (121) 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. (151) 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 (100). 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* (101), otro miembro de la familia Meliaceae.

La purificación de los principios activos responsables de las actividades presentes en el extracto de **A.indica**, determinó que la actividad anticomplementaria es ejercida por dos péptidoglicanos de pesos moleculares 150 kD y 12 kD (152). Por otro lado, compuestos de bajo peso molecular entre los cuales se han identificado al ácido gálico, la (+)-galactocatequina, la (+)-catequina y la (-)-epicatequina, resultan ser los responsables de la inhibición de la producción de radicales libres del oxígeno (153).

trabajos previos de nuestro laboratorio pudieron detectarse actividades inmunomoduladoras en distintas meliáceas. En particular, se comprobó que los extractos acuosos de hojas verdes de Melia azedarach L., una planta con reportada actividad antirreumática (119), son capaces inhibir "in vitro" la fagocitosis y el estallido respiratorio de macrófagos peritoneales murinos. Se demostró asimismo que inhibición del metabolismo oxidativo esta ocurre independientemente de que el estímulo utilizado involucre o no activación de receptores de membrana. Es decir, los la extractos no **s**ólo inhiben la ingestión de antígenos

particulados sino que también ejercen un efecto inhibitorio sobr**e** el metabolismo oxidativo de las fagocíticas (41). En otra serie de estudios se detectó una fuerte actividad anticomplementaria "in vitro" en dichos extractos. La incubación de suero humano con distintas concentraciones de los extractos reduce de un modo dependiente de la dosis la capacidad hemolítica de dicho suero. Esta inhibición es independiente de la vía de activación del complemento ensayada (clásica o alternativa). Por otro lado, el extracto no afecta la actividad fagocítica o el metabolismo oxidativo de leucocitos polimorfonucleares humanos (22). Es "in vitro" interesante destacar que el tratamiento de linfocitos de bazo de ratón con distintas concentraciones del extracto suprime la proliferación inducida por mitógenos en dichas células (41).

extractos acuosos de Melia azedarach L. presentan una interesante actividad inmunomoduladora "in vivo". El tratamiento con los extractos aumenta la sobrevida de ratones lactantes infectados con el virus Tacaribe, el cual induce en estos animales una encefalopatía mortal de naturaleza inmune (12, 30). Asimismo la administración de los extractos produce una inhibición de la producción de interferón por parte de ratones adultos (11). Por otro lado, el extracto acuoso de M.azedarach presenta distintas actividades inmunosupresoras en el ratón adulto. La administración del extracto por vía la intraperitoneal es capaz de inhibir producción de

anticuerpos, la reacción injerto contra huésped y el edema inducido durante un esquema de hipersensibilidad retardada (41). En todos los casos se evidencia un efecto dosis dependiente del extracto. Por último, cabe destacar que la administración intraperitoneal del extracto a ratones adultos induce una modificación transitoria en la fórmula leucocitaria de los mismos, provocando un aumento en el número de PMN y una disminución en el número de linfocitos circulantes en sangre periferica, sin afectar el recuento de leucocitos totales (20).

Otra meliacea estudiada en nuestro laboratorio ha sido Cedrela tubiflora. Extractos acuosos de dicha planta presentan "in vitro" una importante actividad anticomplementaria tanto en el ratón como en el humano. La incubación de los sueros con el extracto reduce significativamente la capacidad hemolítica de los mismos. El efecto es dosis dependiente y más importante en la vía clásica que en la alterna (23, 24). Dicho efecto es más marcado que el reportado en Melia azedarach L. El tratamiento con el extracto crudo de C. tubiflora también es capaz de inhibir significativamente la fagocitosis y el metabolismo oxidativo de macrófagos murinos. Como en Melia azedarach L., el extracto inhibe el estallido respiratorio independientemente de que el estímulo utilizado involucre o no la activación de receptores de membrana. El efecto antifagocítico también se observa en PMN murinos, aunque en este caso el extracto no es capaz de modificar al metabolismo oxidativo de dichas células (21). Por otro lado, el extracto inhibe "in vitro"

fagocitosis y el metabolismo oxidativo de monocitos y polimorfonucleares de sangre humana periférica. Los linfocitos obtenidos de la misma fuente y tratados "in vitro" con distintas concentraciones del extracto presentan un marcado descenso en su respuesta proliferativa frente a mitógenos (21).

Es interesante destacar que tanto en *Melia azedarach* L. como en *Cedrela tubiflora*, la actividad anticomplementaria resultó estar asociada a fracciones de elevado peso molecular mientras que las actividades antifagocíticas y antimitogénica se encontraron asociadas a fracciones de bajo peso molecular (22, 23, 41).

Todos estos datos llevaron a realizar un screening sobre distintas meliaceas autóctonas con el fin de detectar posibles actividades inmunomoduladoras. En principio se estudió el efecto de extractos acuosos de hojas de distintas plantas sobre la capacidad fagocítica de macrófagos murinos. Las plantas estudiadas fueron: Melia azedarach var. gigantea, Melia azedarach var. variegada, Melia toona, Melia toosedans, Cedrela lilloi, Trichilia elegans y Trichilia glabra (114). Los resultados expresados como CI50% (concentración de extracto en mg/ml que reduce la capacidad fagocítica al 50%) se observan en el Cuadro 6:

CUADRO 6: ACTIVIDAD ANTIFAGOCÍTICA DE DISTINTAS MELIACEAS

Planta	CI50%
Melia azedarach var. gigantea Melia azedarach var. variegada Melia toona Melia toosedans Melia caoba Cedrela lilloi Trichilia elegans Trichilia glabra	sin actividad 1,33 0,41 0,40 0,94 0,05 0,026 0,02

En este Cuadro se puede observar que las plantas con mayor antifagocítica resultaron ser Cedrela actividad lilloi, Trichilia elegans y Trichilia glabra por lo que fueron elegidas continuar los estudios. En particular, para preliminares han reportado la presencia de actividad anticomplementaria "in vitro" en los extractos acuosos de Cedrela lilloi y Trichilia elegans. Ambos extractos también presentaron efectos inhibitorios sobre la capacidad fagocítica y el metabolismo oxidativo de macrófagos murinos y sobre la proliferación de linfocitos de bazo. Por último, cabe destacar que dichos extractos ejercen "in vivo" un efecto supresor sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada en el ratón albino (114).

El presente trabajo de tesis es un compendio de los estudios realizados en el ratón sobre las actividades inmunomoduladoras presentes en los extractos acuosos de hojas verdes de la tercera de de las meliaceas escogidas: Trichilia glabra.

OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivos:

- 1) Investigar la presencia de actividades inmunomoduladoras sobre el sistema inmune del ratón del extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra*. Para esto se estudió el efecto de dicho extracto sobre distintos parámetros de la respuesta inmune del ratón adulto cepa Balb/c tanto "in vivo" como "in vitro".
- Realizar una caracterización bioquímica básica de las actividades investigadas.
- 3) Intentar purificar los principios activos responsables de las distintas actividades biológicas estudiadas.

MATERIALES Y METODOS

1.- Animales

Se emplearon ratones de la cepa endocriada Balb/c tanto para los estudios "in vitro" como para los estudios "in vivo". 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/cJ [H-2^d] x AKR/J [H-2^k]) y F1(Balb/cJ x DBA/2J [H-2^d]). 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.- Complemento

Como fuente de complemento se utilizó suero fresco de ratón. Para obtenerlo grupos de 10 ratones fueron exanguinados y las muestras de sangre se incubaron a 37°C en baño de agua durante 30 min, separándose el suero por centrifugación a bajas revoluciones en centrífuga refrigerada. Dichos sueros se juntaron e inmediatamente fueron utilizados para los ensayos de actividad anticomplementaria.

3.- Células

3.1.- Líneas celulares

Se emplearon células Vero (riñon de mono verde africano, Cercopithecus aethiops) y L-929 (fibroblastos de ratón). Estas líneas fueron crecidas en monocapa con Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM, Gibco) suplementado con 5 % de suero de ternera (Gibco) previamente inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min y 50 μg/ml de gentamicina (medio de crecimiento). El mantenimiento de estas líneas celulares se realizó a 33°C en MEM 2 % suero de ternera inactivado y 50 μg/ml de gentamicina (medio de mantenimiento).

3.2.- Obtención de células peritoneales adherentes (CPA) de ratón

3.2.1. - 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 estéril de almidón al 2% P/V en buffer salino fosfatado (PBS).

Para obtener los exudados peritoneales se procedió según se describe a continuación (174). Los animales se sangraron a blanco, luego de lo cual 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 (120) fue siempre superior al 95%. Por tinción con naranja de acridina (66) se determinó que la proporción de macrófagos en el exudado peritoneal era del 90%.

Para establecer los cultivos, se sembró 1 ml de una suspensión de CPA que contenía 3 x 10^4 macrófagos sobre laminillas de vidrio en tubos Leighton. Después de 2 h de incubación a 37° C, se removieron las células no adherentes y se cubrieron los cultivos con medio de crecimiento.

3.2.2.- Polimorfonucleares (PMN)

Los animales utilizados como fuente de células recibieron 6 h antes de ser sacrificados, una dosis de 3 ml de caldo tioglicolato al 2% por vía ip. Las células peritoneales enriquecidas en PMN se cosecharon siguiendo el protocolo descripto en 3.2.1.

Se establecieron los cultivos sembrando en tubos Leighton $1\ ml\ de\ una\ suspensión de\ CPA\ que contenía <math>2\ x\ 10^6\ células.$

Se dejaron adherir las células durante 2 h a 37°C, determinándose, por recuento diferencial luego de una tinción con May Grunwald-Giemsa, que más del 90% de las células adherentes eran PMN.

3.3.- Obtención de células de bazo y ganglio de ratón

Se emplearon ratones normales para obtener las células según se detalla a continuación. Los animales sacrificados por dislocación cervical y luego se extrajo el bazo o el ganglio poplíteo. Las células de estos órganos se disgregaron contra mallas estériles de alambre fino de acero inoxidable. Se utilizó RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino para lavar los órganos y recoger las células obtenidas. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 900 x q durante 10 min. El sedimento celular se lavó tres veces medio ya mencionado. Finalmente, las células resuspendieron en 2 ml de RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10^{-5} M de 2-ßmercaptoetanol y 50 µg/ml de gentamicina (medio completo para linfocitos). Se contaron las células vivas en una cámara de Newbauer aplicando método de exclusión de azul tripán previa lisis de los glóbulos rojos por medio de un shock hipotónico.

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 masa celular a inocular correspondiera a volúmenes de 0,05 ml.

Por otro lado, se establecieron cultivos en microplacas de 96 pocillos de fondo plano, sembrándose 2×10^5 células en cada uno de ellos, en presencia de 4 µg/ml de Concanavalina A (Con A, Sigma Chemical Co), 10 µg/ml de Lipopolisacárido (LPS, Sigma Chemical Co) y se incubaron a 37° C en estufa gaseada (atmósfera de 5% de CO_2).

En otra serie de experimentos se empleó una suspensión de células de bazo depletadas de adherentes. Para ello, una suspensión de células de bazo obtenida como se describió anteriormente, fue incubada durante una hora a 37°C en un caja de Petri de plástico, recogiéndose el sobrenadante (que contenía células no adheridas al plástico) una hora más tarde. Dicha suspensión se sometió a una segunda incubación en iguales condiciones. De esta manera se buscó disminuir la proporción de células adherentes presentes en la suspensión celular, entre ellas los macrófagos. La suspensión celular así obtenida fue utilizada para realizar ensayos de proliferación en presencia o ausencia del extracto.

4.- Virus

El virus usado durante el desarrollo de las experiencias fue el virus Herpes simplex tipo I (HSV-I) cepa KOS mantenido en el laboratorio por pasajes en células Vero.

4.1. - Preparación del 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 48 h a 37°C. Al cabo de este período se cosechó el virus intracelular por congelado y descongelado (3X) a -70°C, centrifugando los sobrenadantes así obtenidos 10 min a 1500 x g para bajar restos celulares. El sobrenadante se conservó a -70°C sirviendo como stock de virus.

4.2.- Titulación del stock viral

El stock se tituló por el método de unidades formadoras de placas (UFP). Para tal fin, se prepararon diluciones seriadas al décimo del stock viral en medio de mantenimiento. Se inocularon (por triplicado) botellas de cultivo 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

hora a 37°C, se volcó el inóculo y se cubrieron las células con 3 ml de una mezcla en una relación 1:1 de agar 1,6% y medio de mantenimiento doble concentrado. Una vez solidificado el medio, 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, luego de lo cual se tiñeron con cristal violeta 1 % durante 15 min y se contaron las placas de lisis resultantes. El título se calculó según la siguiente fórmula:

Título= n/v x d

siendo: n= n° de placas contadas.

v= volumen de inóculo.

d= dilución viral

El stock empleado en los experimentos tenía un título de 4 x 10^6 UFP/ml.

5.- Material vegetal

5.1. - Recolección del material vegetal

Todos los extractos empleados se obtuvieron a partir de hojas verdes y sanas de *Trichilia glabra*, recolectadas cada año durante los meses de noviembre a marzo en distintas zonas de la Capital Federal. Estas hojas fueron lavadas con agua destilada, se escurrieron y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

5.2. - Preparación del extracto

Se hizo un homogenato en licuadora de hojas verdes de Trichilia glabra 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 10.000 x g para clarificar. El sobrenadante fue esterilizado por filtración. Toda la operación se realizó a 4°C. A esta fracción se la denominó Extracto Crudo, siendo su concentración de 40 mg de material vegetal por ml de solución estimado por desecación en estufa.

6.- Ensayos "in vitro"

6.1. - Ensayo de actividad hemolítica del complemento

El suero utilizado como fuente de complemento se obtuvo de ratones BALB/c según se indicó en 2. Como sistema indicador de la actividad hemolítica presente en el suero se utilizaron glóbulos rojos de conejo (GRCo) opsonizados con IgM antiGRCo (vía clásica) o sin opsonizar (vía alterna) (125, 154, 155).

La concentración óptima de suero (aquella que produce el 40 - 60% de hemólisis del sistema indicador) se determinó mediante la ecuación de Von Krogh (108).

Se usó buffer salino veronal (VBS) conteniendo veronal 5 mM y NaCl 150 mM, pH 7,4. Este fue suplementado con Mg $^{++}$ (0,95 mM) y Ca $^{++}$ (0,15 mM) (VBS++) o con Mg $^{++}$ (95 mM) y ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil)tetraacético (EGTA 8 mM) (VBS-EGTA).

Todos los reactivos se diluyeron en VBS^{++} (vía clásica) o VBS-EGTA (vía alterna).

Para determinar la actividad anticomplementaria del extracto, 0,4 ml de la dilución apropiada del suero se incubaron a 37°C con 0,4 ml de distintas diluciones del extracto en VBS++ o VBS-EGTA. Luego de 30 min, se agregaron 0,2 ml de una suspensión al 1,4% de GRCo (opsonizados o no según el caso) y se continuó la incubación durante 1 hora (vía clásica) o 30 min (vía alterna). Posteriormente, se centrifugaron los tubos de reacción 10 min a 800 x g en centrífuga refrigerada y se determinó la absorbancia de los sobrenadantes (I) a 541 nm (93). El porcentaje de inhibición de hemólisis se calculó según la siguiente fórmula:

% de inhibición = $100 - (I-II)/(III - IV) \times 100$ donde II se refiere a la absorbancia a 541 nm (A_{541}) de un sobrenadante al cual se le agregó buffer en lugar de suero. Como el extracto es coloreado, este control se realizó para cada dilución del extracto ensayada. III indica la A_{541} del control de lisis (100 % de hemólisis) y IV es la A_{541} de los sobrenadantes correspondiente al control de GRCo más buffer (0 % de hemólisis) (108).

6.2.- Determinación del efecto del extracto sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales murinos

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.

6.2.1. - Opsonización de GRC

Se preparó una suspensión de GRC al 5% v/v en PBS. Se diluyó en el mismo buffer IgG de conejo anti GRC a la máxima dosis no aglutinante y se agregó a un volumen de la suspensión de GRC, otro volumen del antisuero diluído, mezclando bien. Se incubó la mezcla 30 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 los glóbulos rojos fueron resuspendidos en PBS en un volumen igual al de partida.

6.2.2. - Ensayo de opsonoeritrofagocitosis

Los cultivos de CPA de ratón obtenidos como se describió anteriormente (ver 3.2) fueron incubados durante 24 h a 37°C con distintas diluciones de extracto (tratados) o con MEM (controles). Al cabo de este período se lavaron los cultivos

con medio de mantenimiento y se incubaron durante 1 h a 37°C con 1 ml de una suspensión al 0.5% de GRC (v/v) opsonizados en medio de crecimiento. Luego de esto, los cultivos se lavaron exhaustivamente con PBS (para sacar el exceso de eritrocitos). Las células se fijaron con metanol durante 1 min v colorearon con diluído Giemsa (dilución 1:21 en destilada). En algunos ensayos se procedió a lisar los glóbulos rojos adheridos a la superficie de las células. Para ello, antes de fijar las células se las incubó durante 15 min con una solución hipotónica (0,15 M) de ClNH4.

Dichos preparados fueron observados al microscopio óptico (1000 x) y se calculó el porcentaje de fagocitosis obtenido según la siguiente fórmula:

% de fagocitosis = (n° cél. pos./n° cél. total) x 100.

Se contaron por lo menos 100 células por cultivo y se consideraron células positivas para la fagocitosis a aquellas que incorporaran más de 4 GRC opsonizados.

Comparando los porcentajes de fagocitosis de las células tratadas У los controles se determinó la actividad antifagocítica del extracto, lo que se expresa como inhibitoria (CI50%) concentración 50% es decir, concentración del extracto que reduce al 50% la fagocitosis de los cultivos tratados respecto del control.

6.2.3.- Reversibilidad del efecto del extracto sobre la capacidad fagocítica

Se obtuvieron cultivos de CPA murinas y se incubaron con medio de crecimiento (controles) o con una determinada concentración del extracto (0,25 mg/ml) 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 medio de mantenimiento. Los cultivos se cubrieron con medio de mantenimiento y se continuó la incubación a 37°C. A distintos tiempos después de retirar el medio de cultivo con el extracto, se realizó el ensayo de opsonoeritrofagocitosis ya descripto anteriormente.

6.2.4.- Cinética de establecimiento del efecto inhibitorio del extracto sobre la capacidad fagocítica de macrófagos murinos

Para determinar el tiempo necesario para que se manifieste еl efecto de los extractos sobre la fagocitosis, se establecieron cultivos de células peritoneales residentes en medio de crecimiento. A distintos tiempos antes de dosar la capacidad fagocítica, el medio se reemplazó por una determinada concentración (0,25 mg/ml)del extracto en medio de crecimiento.

En todos los casos el ensayo de opsonoeritrofagocitosis se realizó 24 h después de establecido el cultivo.

6.2.5.- Efecto del extracto sobre la fagocitosis de partículas de sílica

El siguiente ensayo se basó en los estudios de la citotoxicidad de la sílica sobre los macrófagos desarrollados por Allison y col. (3). Brevemente, se obtuvieron cultivos de CPA murinas y se incubaron en medio de crecimiento (controles) o con distintas diluciones del extracto en el mismo medio (tratados) durante 24 h a 37°C. Al cabo de este período, se volcaron los sobrenadantes y se lavaron los células con medio fresco. Los cultivos se cubrieron con medio fresco conteniendo una concentración de 0,2 mg/ml de sílica (MERCK) (tamaño de las particulas = $2.5 \mu m - 10 \mu m$) y se incubaron durante 4 h a 37° C. Una vez finalizada esta incubación se lavaron los cultivos exhaustivamente con medio fresco para eliminar los restos de sílica y se continuó la incubación con medio de crecimiento por un período adicional de 72 h. Al cabo de este tiempo se fijaron las células con metanol y se tiñeron con Giemsa. Se contaron 30 campos al azar y se comparó el número de células presentes en tratados y controles.

6.2.6.- Efecto del extracto sobre la formación de rosetas

Los cultivos de CPA de ratón obtenidos como se describió anteriormente fueron incubados durante 24 h a 37°C con medio de crecimiento (controles) o con distintas diluciones de extracto en el mismo medio (tratados). Al cabo de este período se lavaron los cultivos con medio de mantenimiento y se desafiaron con 1 ml de una suspensión al 0,5% (v/v) de GRC opsonizados en medio de crecimiento. Los cultivos se incubaron durante 1 h a 4°C, luego de lo cual se eliminó el exceso de eritrocitos por lavado con PBS. Las células se fijaron con metanol y se colorearon con Giemsa. El porcentaje de rosetas se calculó según la siguiente fórmula:

% de rosetas= (n° rosetas/n° cél. total) x 100.

Se contaron por lo menos 100 células por cultivo y se consideraron como rosetas a aquellas células que tuvieran adheridos más de 4 GRC opsonizados.

6.2.7.- Determinación del efecto del extracto sobre a producción 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. El estallido respiratorio también puede ser inducido en ausencia de un estímulo fagocítico activando la proteína quinasa C por medio del forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la activación del metabolismo oxidativo se utilizó las técnica de reducción del azul de tetrazolio.

6.2.7.1. - Opsonización de zimosan

Diez miligramos de zimosan (SIGMA) 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).

6.2.7.2.- Ensayo de reducción del azul de tetrazolio (NBT)

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 laminillas de vidrio en tubos Leighton. Se sembró en cada tubo 1 ml de una suspensión de CPA conteniéndo 1 x 105 macrófagos. Las células se dejaron adherir por incubación durante 2 h a 37°C. Al cabo de este período se retiró el sobrenadante y se lo reemplazó por 1 ml de medio de crecimiento (cultivos controles) o por igual volumen de una dilución de extracto en dicho medio (tratados). Los cultivos se incubaron 24 h a 37°C. Luego, el sobrenadante se reemplazó por 1 ml de medio de crecimiento suplementado con 0,5 mg/ml de NBT (SIGMA) y 1 mg/ml de zimosán opsonizado (estímulo fagocítico) o 0,01 ml de una solución 8,3 x 10^{-6} M de PMA (SIGMA) (estímulo no fagocítico). Las células se incubaron 30 min a 37°C, se reemplazó nuevamente el sobrenadante con medio de crecimiento y se continuó la incubación otros 30 min a 37°C. Pasado este tiempo, los cultivos se fijaron 1 min con metanol y se colorearon con fucsina diluída.

En cada cultivo se contabilizaron como positivas a todas aquellas células que presentaran depósitos intracitoplasmáticos de la sal de formazán.

6.2.8.- Efecto del extracto sobre el consumo de glucosa de macrófagos peritoneales

Cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos fue sembrada con 200 μ l de una suspensión de CPA de 10⁷ cels/ml. Las células

se dejaron adherir durante 2 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ obteniéndose así una monocapa celular. Finalizada esta incubación los cultivos se lavaron con medio fresco y luego se cubrieron con 200 µl de medio de crecimiento (controles) o distintas diluciones del extracto en el mismo medio (tratados). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Veinticuatro horas más tarde se determinó la concentración de glucosa presente en los sobrenadantes del medio de cultivo por medio de un ensayo enzimático (Glicemia enzimática, Wiener lab.). Se compararon los valores registrados para los cultivos tratados y los controles con respecto a la concentración de glucosa presente en medio fresco.

6.2.9.- Efecto del extracto sobre la infección de macrófagos peritoneales murinos con virus Herpes simplex tipo I

Se establecieron cultivos de CPA (tratados y controles) de igual modo a lo indicado en el punto 2. Las células se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂. Veinticuatro horas más tarde se retiraron los sobrenadantes y los cultivos se infectaron con HSV-I a una multiplicidad de infección de 0,1 UFP/célula. Después de una hora de adsorción se lavaron las monocapas y se incubaron con medio de crecimiento durante 48 hs a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Finalizado este tiempo el virus se

cosechó por congelado-descongelado, se clarificó y se tituló por el método de unidades formadoras de placas.

6.2.10.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la expresión de distintas moléculas en la membrana de macrófagos peritoneales murinos

Con el fin de estudiar el efecto del extracto sobre la expresión de moléculas presentes en la membrana de macrófagos peritoneales murinos se utilizaron los anticuerpos monoclonales OX6 y 13/2 (Sigma chemical Co.) marcados con isotiocianato de fluoresceina. El anticuerpo monoclonal OX6 reconoce moléculas de clase ΙI del complejo mayor de histocompatibilidad codificadas por la región I-A de los haplotipos k y s, mientras que el anticuerpo monoclonal 13/2 reconoce la isoforma de 200 Kd del antígeno CD45. Dicho antígeno está constituído por un grupo de glicoproteínas de membrana con actividad de tirosina fosfatasa cuyos pesos moleculares oscilan entre 180 y 220 Kd. Dicho antígeno se expresa en leucocitos maduros e inmaduros, incluvendo células B Τ, timocitos, ν PMN fagocitos V mononucleares (71, 84). Para determinar el efecto del extracto sobre la expresión la membrana de los macrófagos en peritoneales de los antígenos reconocidos por dichos anticuerpos, cultivos de dichas células fueron incubados durante 24 hs a 37°C con medio de mantenimiento (controles) o

distintas concentraciones del extracto (0,03 - 0,5 mg/ml) en el mismo medio. Una vez finalizada esta incubación las células se se lavaron con PBS a temperatura ambiente durante 20 min y luego se fijaron durante 30 min a -20°C con una mezcla 1:1 de metanol y acetona. La células así tratadas se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con una dilución 1/40 en PBS de la solución de OX6 o de 13/2. Una vez finalizada esta incubación los cultivos recibieron dos lavados sucesivos en PBS. Luego los cultivos se montaron con glicerina tamponada y se observaron en un microscopio con iluminación UV a 1000 x. Se determinó el número de células fluorescentes en 20 campos y se compararon los valores de los cultivos tratados respecto a los controles sin tratar.

6.2.11. - Efecto del extracto sobre PMN murinos

Cultivos de PMN murinos obtenidos como se describió incubaron 45 min a 37°C con medio anteriormente se de crecimiento (controles) o distintas diluciones del extracto en dicho medio (tratados). Al cabo de este tiempo los cultivos se lavaron con medio de cultivo evaluándose la las células fagocítica de por un ensayo de opsonoeritrofagocitosis, el estallido respiratorio por la técnica de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) (176) y la viabilidad celular por el método de exclusión del azul tripán.

6.3.- Determinación del efecto del extracto sobre los linfocitos

6.3.1. - Ensayo de incorporación de (3H) Timidina

Luego de 72 h. de incubación de los cultivos de linfocitos, en presencia ausencia de distintas 0 concentraciones de extracto, se agregaron a cada cultivo de linfocitos (10⁵ células por pocillo), 10 µCi de (³H) Timidina (actividad específica = 6,7 Ci/mM) (Dupont, New Research Products, Boston, USA). Los cultivos se mantuvieron en estufa gaseada (atmósfera de 5% CO₂) a 37°C durante 18 h y a continuación. se cosecharon las células utilizando cosechador automático células. La para 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.

6.3.2.- Efecto del extracto sobre la producción de interferón Gamma (IFN)

6.3.2.1. - Inducción de IFN gamma

Se establecieron cultivos de linfocitos. Para ello 2 x 10^5 células esplénicas fueron incubadas con 5 µg/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°C para dosar IFN.

6.3.2.2. Titulación de IFN gamma

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

Monocapas de células L-929 se pretrataron (por duplicado) 24 h a 37°C en estufa gaseada (atmósfera de 5% CO₂) con medio de mantenimiento (controles) o diluciones seriadas al medio, en el mismo medio, de los sobrenadantes obtenidos según se especifica en el ítem anterior (tratados). Finalizada esta incubación, todos los cultivos, tanto tratados como no tratados, se desafiaron con 100 UFP de VSV. Luego de 1 hora de adsorción del inóculo viral, las monocapas celulares se incubaron durante 48 h con medio de plaqueo (una mezcla de medio de mantenimiento doble concentración y metilcelulosa 1,4% en una relación 1:1). 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 lisis virales.

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 lisis en un 50% respecto de los controles infectados no pretratados.

7.- Ensayos "in vivo"

7.1. - Toxicidad de extracto acuoso en el ratón

Grupos de 10 animales fueron inoculados por vía endovenosa con una dosis diaria de 0,8 mg del extracto acuoso de *T.glabra* en un volumen de 0,2 ml durante 10 días consecutivos. A lo largo de este tiempo se evaluaron peso, morbilidad y mortalidad como parámetros de toxicidad.

7.2.- Actividad anticomplementaria "in vivo"

7.2.1.- Efecto de distintas concentraciones del extracto acuoso sobre la actividad hemolítica del suero de ratones tratados

Grupos de 10 ratones fueron inoculados por vía endovenosa con 0,2 ml de distintas concentraciones del extracto (tratados) o PBS (control). A las 12 h post-inoculación se exanguinaron los animales por el seno retroorbital determinándose la capacidad hemolítica de los sueros por el método descripto anteriormente en la sección 6.1. El grado de inhibición de la capacidad hemolítica se calculó por la siguiente fórmula:

% de Inhibición = 100 - (% hemólisis tratados/controles).

7.2.2.- Cinética del efecto anticomplementaria observado en el suero de animales tratados

Grupos de 10 ratones fueron inoculados por vía endovenosa con 0,2 ml de una dilución al décimo del extracto crudo en PBS (tratados) o igual volumen del diluyente (controles). A distintos tiempos post-inoculación los animales fueron exanguinados determinándose la capacidad hemolítica de los sueros. El porcentaje de inhibición de la capacidad hemolítica se obtuvo como en el experimento anterior.

7.3.- Determinación del efecto de los extractos sobre la respuesta inmune humoral

7.3.1.- Esquemas de tratamientos e inmunización de los animales

Se estudió la producción de anticuerpos hemaglutinantes en grupos de 10 ratones Balb/c adultos inoculados diariamente con una dilución al décimo del extracto en PBS (4 mg/ml) (tratados) o con igual volumen del diluyente (controles). Se utilizaron distintas vías de inoculación del extracto, variando en algunos casos la duración del tratamiento.

Los ratones tratados y los controles fueron inmunizados por vía ip con 0,1 ml de una suspensión de GRC al 30% v/v en PBS (día 0).

Los esquemas de tratamiento empleados fueron los que se muestran en el siguiente Cuadro:

Días de tratamiento	Volumen de inóculo (ml)	Vía de inoculación
-2,-1,0,+1,+2	0,5	ip
-2,-1,0	0,5	ip
-2,-1,0	0,2	ev
-2,-1,0	0,3	ig

ip= intraperitoneal, ev= endovenoso, ig=intragástrica

Cinco días después de la inmunización, los ratones se sangraron a blanco por punción retroorbital y la sangre obtenida se incubó 1 h a 37°C. Luego una noche a 4°C se separó el suero en forma estéril inactivándose por calentamiento a 56°C durante 30 min. Los sueros se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

7.3.2. Titulación de anticuerpos hemaglutinantes séricos de ratón

Se empleó una microtécnica para lo cual se usaron microplacas de 96 pocillos con fondo en "U" (81).

En primer lugar, se sembraron en cada pocillo 25 μ l de PBS. Luego, en los primeros pocillos de cada serie se sembraron 25 μ l de cada suero a dosar (previamente inactivado por

calentamiento a 56°C durante 30 min) y mediante microdiluidores de 25 μ l se hicieron diluciones seriadas al medio. Finalmente, en cada pocillo se agregaron 25 μ l de una suspensión de GRC al 1% v/v en PBS. Se dispuso de pocillos control con 25 μ l de PBS a los que también se les agregó 25 μ l de 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 У 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 produjo hemaglutinación positiva.

7.4.- Determinación del efecto del extracto sobre la respuesta inmune celular

7.4.1. - Reacción de injerto contra huésped

Se empleó el ensayo local de Ford y Simonsen (58) para evaluar la alorreactividad T. Este ensayo consiste en la inoculación de células inmunocompetentes de animales de una cepa endocriada A, en una de las almohadillas plantares de un híbrido F1 adulto derivado del cruzamiento entre la cepa A y

otra cepa В. 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 local de injerto contra huésped, en la que fundamentalmente interesa el ganglio poplíteo drenante de la almohadilla plantar inoculada. La reacción puede cuantificarse determinando 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.

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 por vía ev simultaneamente con las células de la cepa parental.

7.4.2. - 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 antigeno. Al tomar contacto por segunda vez con el mismo antígeno, dichas células reacionan proliferando y liberando citoquinas que atraen otros tipos celulares al lugar del desafío, en el que se produce reacción una inflamatorio.

Se inocularon ratones por vía ip con 0,2 ml de una suspensión celular que contenía 1 x 10^6 GRC (día 0). Los mismos animales recibieron, siete días más tarde (día + 7), 0,05 ml. de una suspensión de GRC conteniendo 1 x 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 de precisión. La diferencia de grosor entre ambas almohadillas

se consideró como medida de la respuesta producida en el huésped frente al antígeno.

Para analizar el efecto de los extractos sobre esta respuesta, grupos de 10 ratones fueron inoculados por vía ev con 0,1 ml de una dilución del extracto en PBS (tratados) o igual volumen del diluyente (controles). Los ratones se sometieron a los siguientes esquemas de tratamiento.

Días de de tratamiento	Concentración del extracto (mg/ml)
-2 a 0	0 0,5 1 2 4
+4 a +7	0 0,5 1 2 4

7.4.3.- Efecto del extracto sobre la respuesta de inflamación inmediata

El efecto del extracto sobre la inflamación inducida por zimosán se estudió en grupos de 10 ratones BALB/c. En este tipo de respuesta inflamatoria local intervienen principalmente PMN y el complemento (132). La inflamación fue inducida por una injección subcutánea en la almohadilla plantar derecha de 300

μg de zimosán suspendidos en 25 μl de PBS. La almohadilla plantar izquierda recibió igual volumen de PBS. Luego de 6 h se midió el grosor de ambas almohadillas utilizando un calibre de precisión. 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 del extracto sobre esta respuesta, grupos de 10 ratones se inocularon por vía ev a las 6 y a las 3 h preinducción con 0,2 ml de distintas diluciones del extracto en PBS (tratados) o con igual volumen del diluyente (controles). Los animales se dividieron en 3 grupos los cuales recibieron concentraciones del extracto de 4, 2 y 1 mg/ml respectivamente.

7.4.4.- Fagocitosis "in vivo"

La actividad fagocítica del sistema retículo endotelial murino se determinó según la técnica de Hudson y Hay (81). Grupos de 10 ratones cada uno fueron inoculados durante dos días consecutivos, por vía ev, con 0,2 ml de una dilución al décimo del extracto en PBS (tratados) o igual volumen del diluyente (controles). Seis horas después de administrarse la última dosis del extracto los animales recibieron por vía ev 0,2 ml de una suspensión de carbón coloidal al 1% en PBS. A los 3, 5, 10, 20, 30 y 60 min post-inoculación se extrajeron 25 µl de sangre de cada animal y se lisaron los glóbulos rojos en 2

ml de agua destilada. La absorbancia de las muestras se midió al espectrofotómetro a 675 nm. Con los datos obtenidos con los animales controles y los tratados, se realizaron gráficos de absorbancia en función del tiempo. La tasa de eliminación del carbón en sangre por acción del sistema retículo endotelial surge de calcular la pendiente de las curvas así obtenidas. Se compararon las tasas eliminación del carbón de los animales tratados y los controles.

8. - Análisis estadístico

Todos los estudios estadísticos se realizaron utilizando el test "t" de Student (137).

9.- Caracterización bioquímica de las actividades presentes en los extractos de *Trichilia glabra*

9.1. - Técnicas básicas

9.1.1. - Determinación del peso seco del extracto

Para obtener el peso seco del extracto, un determinado volumen del material se colocó en estufa a 60°C y fue calentado hasta sequedad total. El material desecado se pesó y teniendo

en cuenta el volumen de partida se obtuvo la concentración del extracto.

9.1.2. - Dosaje de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (32), usando como patrón una solución de albúmina bovina de 0,5 mg/ml. En algunos casos la elución de proteínas de las columnas cromatográficas se registró por lectura de la D.O. a 280 nm.

9.1.3. - Dosaje de azúcares

La concentración de azúcares se estimó por el método del fenol-ácido sulfúrico (50), empleando como patrón una solución de 0,5 mg/ml de glucosa.

9.2.- Ensayos realizados para la caracterización de los principios activos

9.2.1.- Diálisis

Una alícuota del extracto crudo se sometió a diálisis exhaustiva frente a H_2O destilada a $4^{O}C$. Para ello se utilizó una bolsa de diálisis que impedía la exclusión de moléculas de PM mayor de 10.000 Dalton. Por otro lado, con el fin de obtener

las moléculas de bajo peso molecular presentes en el extracto se procedió a realizar una diálisis reversa para lo cual se colocó en un volumen grande de extracto una bolsa de diálisis cerrada conteniendo $\rm H_2O$ destilada. Veinticuatro horas más tarde se recogió el material ingresado por difusión en el interior de la bolsa (PM < 10,000).

Se determinaron las actividades biológicas presentes en ambas fracciones (PM > 10,000 y PM < 10,000).

9.2.2. - Estabilidad térmica

Alícuotas del extracto crudo se incubaron durante 2 h a distintas temperaturas (40, 60, 80 y 100°C). Posteriormente se determinó la actividad biológica presente en dichas fracciones.

9.2.3. - Sensibilidad al agregado de ácidos y álcalis

Alícuotas del extracto crudo se llevaron a pH 2 o pH 10 por agregado de HCl 1 M o NaOH 1 N respectivamente; una alícuota control se mantuvo a pH 7. Luego de 3 h de incubación a 37°C las muestras se llevaron a neutralidad, se centrifugaron y se conservaron a -20°C hasta la determinación de su actividad biológica.

9.2.4. - Tratamiento con tripsina y proteinasa K

Distintas alícuotas del extracto crudo fueron incubadadas "in vitro" con tripsina de páncreas bovino (GIBCO) o proteinasa K (SIGMA). Las concentraciones de enzimas en las mezclas de reacción fueron de 20, 10 y 5 mg/ml para la tripsina y de 0,2; 0,1 y 0,01 mg/ml para la proteinasa K. Luego de 2 h de incubación a 37°C las muestras se calentaron a ebullición durante 1 h y luego se diluyeron en medio de crecimiento (con un agregado de 15 % de suero de ternera en el caso de la tripsina para frenar la posible actividad proteolítica remanente luego de la desnaturalización por calentamiento) a fin de determinar su actividad biológica.

9.2.5.- Precipitación con alcoholes

Alícuotas del extracto crudo se mezclaron con 4 volúmenes de etanol o isopropanol y se mantuvieron durante una hora en baño de hielo. El material insoluble se separó por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. Los precipitados se resuspendieron en agua destilada y se los conservó a -20°C hasta la determinación de su actividad.

9.2.6.- Cromatografía de filtración molecular en columna de Sephadex G-50

Un volumen de 0,5 ml del extracto crudo se sembró en una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia) de 50 ml de volumen total equilibrada previamente con PBS. La columna se eluyó con el buffer de equilibrio recogiéndose fracciones de 60 gotas cada una (aproximadamente 3 ml). Las fracciones se conservaron a -20°C y hasta la determinación de su actividad biológica.

9.2.6.1. - Calibración de la columna de Sephadex G-50

Para la calibración de la columna se utilizaron los siguientes patrones de PM: Apronitina $(6,5 \times 10^3 \text{ D})$, Citocromo C $(1,2 \times 10^4 \text{ D})$ y Anhidrasa carbónica $(2,9 \times 10^4 \text{ D})$ (Sigma, Chemical Co.). Todas estas proteínas se detectaron en las fracciones eluídas por el método de Bradford. Se determinó también el volumen de exclusión con azul Dextrán y el volumen total con cloruro de cobalto.

10.- Purificación de los principios activos presentes en hojas verdes de la planta superior Trichilia glabra

10.1.- Preparación del material seco

Hojas frescas de **Trichilia glabra** se lavaron con H_2O destilada y se secaron entre papeles absorbentes. Luego las hojas se llevaron a estufa y se desecaron a $60^{O}C$. Las hojas secas se molieron hasta obtener un polvo fino. Este material se conservó a $-20^{O}C$ hasta su utilización.

10.2.- Extracción de las hojas secas de Trichilia glabra con distintos solventes

El polvo obtenido a partir de hojas verdes de **Trichilia glabra** se extrajo en Soxhlet con cloroformo durante 6 h. El extracto clorofórmico se evaporó y se lo conservó a -20°C. El residuo de la extracción clorofórmica fue sometido a una extracción en Soxhlet durante 6 h utilizando metanol como solvente. El extracto metanólico se evaporó a sequedad, conservándose a -20°C.

El residuo de la extracción metanólica se extrajo con agua a ebullición durante 4 h, se filtró en caliente y se descartó el material remanente. El extracto acuoso así obtenido se

concentró por evaporación a presión reducida y se conservó a -20° C hasta su utilización.

Una vez concluídas estas operaciones se determinaron las actividades biológicas de las fracciones obtenidas.

10.3.- Purificación de la actividad anticomplementaria

10.3.1.- Obtención de una fracción cruda de polisacáridos

El extracto acuoso obtenido como se explicó anteriormente se mezcló con 4 volúmenes de etanol en frío y el material insoluble obtenido fue separado luego de una centrifugación a 10.000 x g durante una hora. Se descartó el sobrenadante y el material precipitado, se resuspendió en agua destilada y se reprecipitó por el agregado de 4 volúmenes de etanol. El precipitado así obtenido se secó con acetona, se resuspendió en agua destilada y se dializó exhaustivamente contra el mismo solvente. El material dializado se concentró por evaporación a presión reducida obteniéndose de esta manera una fracción cruda de polisacáridos.

10.3.2.- Cromatografía de intercambio iónico en batch (DEAE-Sephadex A-25)

Un volumen de la fracción cruda de polisacáridos se mezcló con 10 volúmenes de Sephadex DEAE-A25 equilibrada en buffer Tris-HCl, 0,02 M, pH 6,5. El sistema se dejó en agitación durante 15 min y seguidamente se lavó con dos volúmenes del mismo buffer. La fracción así obtenida se denominó fracción no adsorbida (N.A.). La resina se eluyó en primer lugar utilizando un gradiente discontinuo de fuerza iónica por agregado de distintas concentraciones de ClNa. Finalmente, se eluyó el material aún presente en la resina por medio de un gradiente discontinuo de pH obtenido por el agregado de distintas concentraciones de NaOH. El siguiente esquema muestra el orden eluídas distintas las condiciones en que fueron las fracciones obtenidas.

FRACCIONES			
Orden de elución	Concentración de NaCl	Concentración de NaOH	
1. Buffer Tris-HCl 0,02 M pH 6,5			
2. Buffer Tris-HCl pH 6,5	0,1 M		
3. Buffer Tris-HCl pH 6,5	0,5 M		
4. Buffer Tris-HCl pH 6,5	1,0 M		
5. Buffer Tris-HCl	1,0 M	0,5 N	
6. Buffer Tris-HCl	1,0 M	1,0 N	

Las seis fracciones obtenidas se dializaron contra agua destilada en forma exhaustiva y se concentraron por evaporación a presión reducida. Posteriormente se determinó la actividad anticomplementaria de cada fracción.

10.3.3.- Cromatografía de filtración molecular en columna de Sepharosa 2B

Una alícuota de 1 ml de la fracción NA resuspendida en PBS se sembró en una columna de Sepharosa 2B de 160 ml de volumen total. La columna se eluyó con PBS recogiéndose fracciones de 3 ml cada una. Se determinó la presencia de azúcares y proteínas por los métodos de fenol-sulfúrico y Bradford respectivamente.

La actividad anticomplementaria de cada fracción fue evaluada por el método detallado en la sección de 6.1.

10.3.3.1. - Calibración de la columna de Sepharosa 2B

Para la calibración de la columna se utilizaron dextranos de PM: 9.300, 39.000, 500.000 y 2.000.000 (SIGMA). Se recogieron fracciones de 3 ml cada una determinándose el perfil de elución de azúcares por el método del fenol-sulfúrico. El volumen total y el volumen muerto de La columna se determinaron utilizando azul Dextrán y cloruro de cobalto.

10.3.3.2. - Determinación del peso molecular

El peso molecular aproximado de los compuestos estudiados fue obtenido a partir del perfil de elución en columnas de filtración molecular. El valor fue estimado de un gráfico del PM en función del Kav obtenido a partir de las sustancias marcadoras empleadas. El Kav se define como la relación:

$$Kav = (Ve - Vo) / (Vt - Vo)$$

donde Ve: volumen de elución de la sustancia.

Vo: volumen de exclusión de la columna.

Vt: volumen total de la columna.

10.4. - Purificación de las actividades antifagocítica
y antimitogénica a partir de la fracción
metanólica

10.4.1.- Partición de la fracción metanólica en un sistema bifásico compuesto por acetato de etilo y aqua

La fracción metanólica fue evaporada a sequedad a presión reducida y se resuspendió en un volumen de agua destilada. Esta solución se particionó con 4 volúmenes de acetato de etilo. Se obtienen así dos fracciones las cuales se evaporan a sequedad, determinándose su masa y actividad biológica.

10.4.2. - Cromatografía en columna de Silicagel 60

La columna de Silicagel 60 (Merck, tamaño de gránulo 0,040-0,063 mm) se armó en seco y luego se equilibró con cloroformo. Para realizar la cromatografía se utilizó una relación de 100 grs de sílica por gramo de muestra. El material a cromatografíar fue preparado como una pastilla seca. Para ello se resuspendió en metanol y se mezcló con 1-2 grs de sílica. El metanol se eliminó por evaporación al vacío y una vez que la muestra estuvo bien seca se aplicó en la columna. La elución se realizó primero con cloroformo y luego con distintas proporciones de cloroformo:metanol (95: 5, 90: 10 y 80:20),

aplicándose dos volúmenes de columna de cada mezcla de solventes. Las fracciones obtenidas se evaporaron al vacío y las diferentes muestras se resuspendieron en agua destilada para ensayarse su actividad antifagocítica y antimitogénica.

10.4.3.- Columna de Sephadex LH-20

Un volumen de 1,0 ml de la fracción activa obtenida de la columna de sílica resuspendida en metanol se sembró en una columna de Sephadex LH-20 (Pharmacia) de 200 ml de volumen total equilibrada previamente con metanol. La columna se eluyó con metanol recogiéndose fracciones de 200 gotas cada una (aproximadamente 3 ml). Las fracciones se conservaron a - 20°C hasta ensayarse la actividad biológica de las mismas.

10.4.4.- Cromatografía en placa delgada

Las fracciones activas obtenidas de la columna de LH-20 se cromatografiaron en placa delgada.

a) Metodo analítico:

Se utilizaron placas con base de alumunio de 5 x 2 cm con soporte de silicagel 60 (Merck), espesor de capa 0,2 mm. El solvente utilizado para la corrida cromatográfica fue una mezcla de cloroformo: metanol, 90 vol 10 vol. Las muestras fueron sembradas con capilares a 0,5 cm del borde inferior y las corridas fueron interrumpidos a 0,2 cm del borde superior.

El reactivo de revelado usado fue 5 % de ácido sulfúrico concentrado en etanol (v/v), seguido de exposición a $100^{\rm OC}$ durante unos min. Los compuestos orgánicos no volátiles dan manchas marrón oscuro a negras sobre fondo blanco.

b) Método preparativo:

Se emplearon cromatofolios con base de aluminio de 20 x 20 cm con soporte de silicagel 60, espesor de capa 0,2 mm. El solvente utilizado para la corrida cromatográfica fue cloroformo metanol, 90 vol 10 vol. Las muestras (20-30 mg/placa) fueron sembradas con capilares a 1,5 cm del borde inferior y las corridas fueron interrumpidas a igual distancia del borde superior.

Los extremos de la placa se revelaron con el reactivo descripto anteriormente y luego se eluyeron las manchas correspondientes de la porción no revelada de la placa con metanol. El solvente fue eliminado por evaporación al vacío y las muestras se resuspendieron en agua destilada para ensayar la actividad biológica de las mismas.

La relación frontal (RF) de las manchas se calculó de la siguiente forma:

Rf= distancia recorrida por la muestra distancia recorrida por el solvente

RESULTADOS

PARTE I: EFECTO DEL TRATAMIENTO IN VITRO CON EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE DISTINTOS COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE DEL RATON

1.- Actividad sobre el complemento del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra

En primer término se quiso determinar si el extracto acuoso de T.glabra inhibía la actividad hemolítica presente en el suero del ratón. Para ello, distintas concentraciones de 37°C con incubaron durante 30 min extracto а se una concentración fija de suero (aquella capaz de lisar entre el 40 y el 60% de un sistema indicador compuesto por eritrocitos de conejo opsonizados [vía clásica] o sin opsonisar alterna]). Luego se adicionó a dichas mezclas el sistema indicador correspondiente a la vía a evaluar y se continuó la incubación a la misma temperatura durante 60 min (vía clásica) o 30 min (vía alterna). Finalmente las mezclas se centrifugaron determinó la absorbancia de los sobrenadantes. se calculándose el % de Inhibición de la hemólisis según se detalla en Materiales y Métodos, Sección 6.1. Como se observa en la Figura 1, el extracto inhibió de una manera dosis dependiente la actividad hemolítica del suero. Dicho efecto se manifiestó en ambas vías de activación del complemento, siendo

más pronunciada en la vía clásica. Las concentraciones inhibitorias 50 % ($\text{CI}_{50\%}$) fueron de 2,4 y 5,1 mg/ml para las vía clásica y la alterna respectivamente ($\text{CI}_{50\%}$ = concentración de extracto que inhibe al 50 % la actividad hemolítica presente en el suero).

En otra serie de experimentos, eritrocitos de conejo opsonizados o sin opsonizar se preincubaron con el extracto durante 30 min a 37°C. Finalizado este período las células se lavaron dos veces con buffer veronal sódico y se incubaron con suero hemolítico en condiciones similares a las descriptas en el ensayo anterior. En este caso no se observó una disminución de la actividad hemolítica del suero en ninguna de las dos vías descartando de este modo un efecto directo del extracto sobre la membrana celular de estas células.

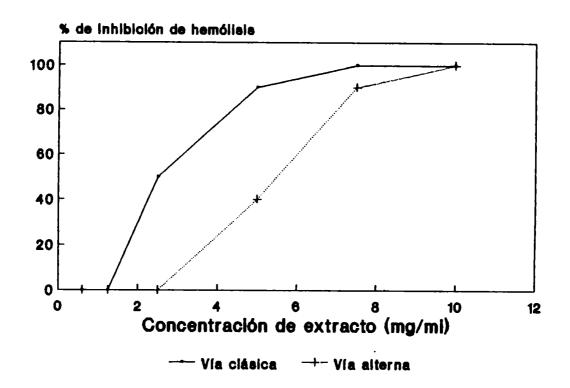


Figura 1: Inhibición de la actividad hemolítica del suero de ratón por incubación con el extracto acuoso de Trichilia glabra.

El suero de ratón se incubó a 37°C con distintas concentraciones del extracto en VBS++ (vía clásica) o VBS-EGTA (vía alterna). Luego de 30 min, se agregó una suspensión al 1,4% de GRCo (opsonizados o no según el caso) y se continuó la incubación durante 1 h (v.c.) o 30 min (v.a.). Posteriormente, se centrifugaron las mezclas de reacción y se determinó la absorbancia de los sobrenadantes (I) a 541 nm. Se calculó el % de inhibición de hemólisis según la fórmula: 100-(I-II)/(III-IV) x 100, donde II se refiere a la absorbancia a 541 nm (A541) de un sobrenadante al cual se le agregó buffer en lugar de suero. III indica la A541 del control de lisis (100 % de hemólisis) y IV es la A541 de los sobrenadantes correspondiente al control de GRCo más buffer (0 % de hemólisis).

- 2.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la actividad biológica de los macrófagos peritoneales murinos.
 - 2.1.- Toxicidad del extracto acuoso de hojas de

 Trichilia glabra para los macrófagos

 peritoneales murinos

En primer lugar se analizó la viabilidad de los cultivos de macrófagos murinos luego de 24 h de incubación en presencia de distintas concentraciones de extracto, utilizando el método de exclusión de azul tripán.

Se observó que a partir de una concentración de 1 mg/ml el extracto resultó ser no tóxico para las células ya que el porcentaje de células viables (95%) en los cultivos tratados con dicha concentración no mostró diferencias significativas respecto a los cultivos control (97%).

2.2.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales murinos

El establecimiento de los cultivos de macrófagos peritoneales se realizó según se detalla en Materiales y Métodos, Sección 3. Las células así obtenidas 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 el extracto provocó una disminución significativa de la capacidad fagocítica de las células peritoneales en un amplio rango de concentraciones, siendo de 27,98 μ g/ml la concentración capaz de reducir al 50% el número de células fagocíticas (CI_{50%}).

La inhibición observada se manifiestó no solamente en una reducción del número de células fagocíticas sino también en una disminución del número de GRC incorporados por célula (Figuras 2a y 2b).

Cuadro 1

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS

Concentración de extracto (mg/ml)	Porcentaje de células	fagocíticas ^a
1,00 0,50 0,25 0,12 0,10 0,05 0,03 0,02 0,01	0,00 ± 0,00 2,45 ± 0,23 5,51 ± 0,40 6,70 ± 3,21 15,82 ± 4,38 30,66 ± 8,32 44,71 ± 6,83 66,34 ± 14,5 87,39 ± 9,23 94,30 ± 8,60	* * *

 $^{^{\}rm a}$ % células fagocíticas = (N°cél. positivas / N°cél. totales) x 100, considerando células positivas aquellas que incorporaron por lo menos 4 GRC.

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

Diferencias significativas tratado vs control:

^{*} p<0,005; ** p<0,01.

n.s.= no significativo.

2a.- Cultivo control (1000 X):

2b.- Cultivo tratado (1000 X):

Figura 2: Aspecto de macrófagos peritoneales murinos incubados durante 24 h en presencia de medio de cultivo (controles) o de 0,50 mg/ml de extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* (tratados) luego de llevar a cabo el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

2.3.- Reversibilidad del efecto del extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre la fagocitosis de los macrófagos peritoneales murinos

Para completar los estudios anteriores se decidió investigar si el efecto antifagocítico de los extractos era reversible.

Para ello se incubaron cultivos de macrófagos peritoneales durante 24 h a 37°C con una concentración de 0,25 mg/ml de extracto en medio de cultivo. Una vez finalizada esta incubación se descartó dicho medio, se lavaron las células y se incubaron a 37°C en medio de mantenimiento sin agregado de extracto. A distintos tiempos después de retirar el extracto del medio de cultivo se dosó la capacidad fagocítica de las células.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

Se observó una reversión parcial del efecto antifagocítico 24 h después de retirar el extracto del medio de cultivo, pero fueron necesarias 72 h de incubación sin extracto para que las células tratadas recuperaran los niveles de fagocitosis de los controles.

La reversibilidad del fenómeno estaría indicando que el tratamiento con el extracto altera de manera temporaria el metabolismo celular de los macrófagos. Teniendo en cuenta los datos obtenidos durante los estudios de viabilidad podemos

concluir que la inhibición observada a esta concentración de extracto no se debería a pérdida de la viabilidad celular o a alteraciones irreversibles de las funciones celulares estudiadas.

2.4.- Cinética de establecimiento del efecto antifagocítico del extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre 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 obsevado.

Para ello, cultivos de macrófagos peritoneales fueron sometidos a distintos tiempos de incubación en presencia de una concentración de 0,25 mg/ml de extracto en medio de cultivo, dosándose luego la capacidad fagocítica dichas células por el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4. Como puede observarse, fueron necesarias 3 h de incubación en presencia del extracto para que se manifestara un efecto antifagocítico significativo. Sin embargo, cabe señalar que

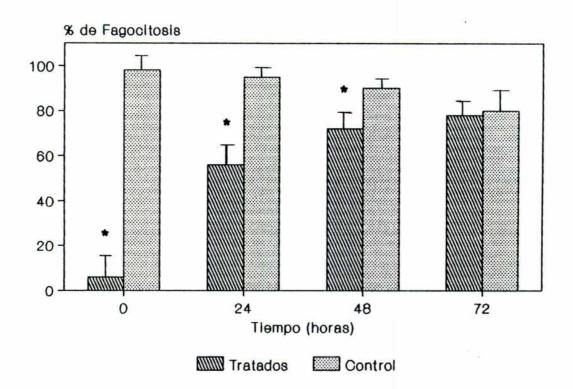


Figura 3: Reversión del efecto antifagocítico del extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre macrófagos peritoneales murinos

Cultivos celulares que contenían 3×10^5 macrófagos fueron incubados durante 24 h en presencia de medio de crecimiento o de 0,25 mg/ml de extracto. A distintos tiempos después de retirar el extracto del medio de cultivo se dosó la capacidad fagocítica de las células mediante el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

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

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

el efecto inhibitorio resultó más acentuado al aumentar el tiempo de incubación con el extracto, llegándose a valores mínimos de fagocitosis (5%) alrededor de las 24 h de tratamiento.

2.5.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la fagocitosis de sílica por macrófagos peritoneales murinos

estudios Para completar los anteriores se decidió investigar si el efecto antifagocítico de los extractos también afectaba a las partículas que ingresaban a la célula por fagocitosis inespecífica. Para ello se eligió la sílica, un compuesto que al ser fagocitado por los macrófagos les provoca la muerte pocas horas más tarde (3). En una serie de experimentos preliminares se determinó que una incubación de 4 h a 37°C con una concentración de 250 µg/ml de sílica en medio de cultivo era suficiente para reducir al 20% la viabilidad de un cultivo de macrófagos peritoneales.

Se consideró que si el extracto era capaz de inhibir la fagocitosis inespecífica también protegería a las células del efecto citotóxico inducido por la sílica.

Con este fin, cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron durante 24 h con distintas concentraciones de

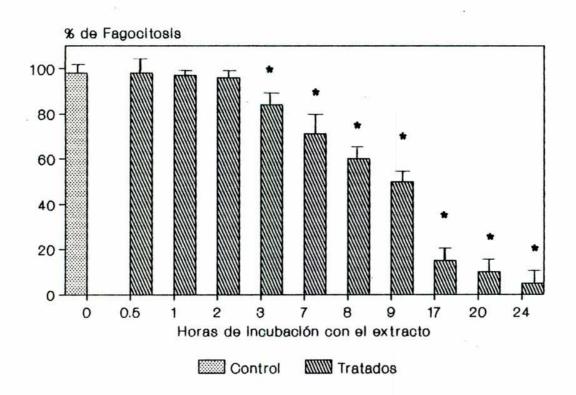


Figura 4: Cinética de establecimiento del efecto antifagocítico del extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre macrófagos peritoneales murinos.

Cultivos celulares que contenían 3×10^5 macrófagos peritoneales murinos fueron incubados distintos tiempos en presencia de 0,25 mg/ml de extracto antes de dosar su capacidad fagocítica mediante el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

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

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

extracto inhibitorias de la opsonoeritrofagocitosis. Luego se lavaron las células y se agregó medio de cultivo conteniendo una concentración de sílica de 250 µg/ml. Después de una incubación de 4 h a 37°C se lavaron las células con medio de mantenimiento y se continuó la incubación en dicho medio por espacio de 48 h. Posteriormente, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Se contaron las células presentes en 20 campos elegidos al azar y se compararon con controles sin sílica. También se realizaron controles con o sin sílica, sin tratar con el extracto.

Como se observa en el Cuadro 2, el número de células en los cultivos tratados con sílica y distintas concentraciones de extracto no difirió significativamente del número de células presentes en los cultivos sólo incubados con sílica, por lo que podemos decir que el tratamiento con el extracto no inhibió la fagocitosis inespecífica de las partículas de sílica.

Por último cabe destacar que en otra serie de experimentos el extracto fue incapaz de inhibir la fagocitosis inespecífica de carbón coloidal por parte de los macrófagos. El porcentaje de células fagocíticas en los cultivos tratados durante 24 h con 0.25 mg/ml de extracto fue de $80 \pm 4.8\%$ lo que no difirió significativamente de los valores obtenidos en los cultivos sin tratar $(84 \pm 6.2\%)$.

Cuadro 2

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

LA FAGOCITOSIS DE SILICA POR MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS

Concentración de extracto (mg/ml)	Número de células ^a (sin sílica)	Número de células ^b (con sílica)
0,12	638 ± 34	112 ± 18
0,10	623 ± 14	130 ± 20
0,05	601 ± 23	117 ± 16
0,00	626 ± 18	123 ± 12

Cultivos de macrófagos peritoneales murinos se trataron durante 24 h con distintas concentraciones del extracto. Las células se lavaron y se incubaron durante 4 h en medio de mantenimiento conteniendo una concentración de sílica de 250 μ g/ml. Luego, las células se lavaron y se incubaron durante 48 h en medio de mantenimiento, se fijaron, se tiñeron y se contaron al microscopio óptico (1000 X). Fueron realizadas tres series de controles: células tratadas con distintas diluciones del extracto y sin sílica, células únicamente tratadas con sílica y_0 células sin tratar.

^a N de células totales en 20 campos.

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

Cabe destacar que este tratamiento es suficiente para reducir al 5% el porcentaje de células fagocíticas en un ensayo normal de opsonoeritrofagocitosis. Resultados similares se obtuvieron en cultivos tratados con menores concentraciones del extracto.

2.6.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la formación de rosetas en macrófagos peritoneales murinos

Con el objeto de determinar si la inhibición observada en la fagocitosis podía deberse a que las células tratadas eran incapaces de unirse a las partículas a fagocitar, se decidió estudiar el efecto del extracto sobre la formación de rosetas entre glóbulos rojos opsonizados y los macrófagos peritoneales de ratón. Para ello, se establecieron cultivos de dichas células los cuales se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto durante 24 h. Luego de este periódo se lavaron las células y se incubaron 1 h a 4°C con una suspensión de glóbulos rojos opsonizados según fue descripto Materiales У Métodos, Sección en 6.2.6, determinándose el porcentaje de rosetas tratados en У controles.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 3. El tratamiento los extractos provocó una disminución con significativa el porcentaje de rosetas, siendo en la concentración que reducía al 50% el número de rosetas (28,32 µg/ml) similar a la concentración que reducía al 50% el número de células fagocíticas (27,98 µg/ml). Es decir que la reducción en el número de células fagocíticas podría explicarse por una incapacidad de las células tratadas para unirse a los eritrocitos opsonizados. Dicha incapacidad podría deberse a una ausencia de receptores para Fc de IgG en la membrana de las células tratadas, si bien no puede descartarse la presencia de receptores no funcionales.

A fin de complementar los estudios del efecto del extracto sobre los macrófagos se realizó una modificación del ensayo de inhibición de la fagocitosis que consistió en lisar los glóbulos rojos adheridos y no fagocitados por medio de un shock osmótico con ClNH4. Esta técnica permite determinar cuáles de macrófagos que presentan eritrocitos adheridos membrana los han internalizado. Si el extracto sólo afectara la adherencia de los eritrocitos, la disminución en el número de células fagocíticas en ambos ensayos sería similar, obteniéndose entonces CI50% semejantes. En caso de que el extracto no sólo ejerciera un efecto sobre la adherencia, como ya quedó demostrado, sino que también presentara un efecto

Cuadro 3

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

LA FORMACION DE ROSETAS ENTRE ERITROCITOS OPSONIZADOS Y

MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS

Concentración de extracto (mg/ml)	Porcentaje de rosetas ^a
1,00 0,50 0,25 0,12 0,10 0,05 0,03 0,02 0,01	0,00 ± 0,00 * 3,64 ± 1,52 * 7,14 ± 1,37 * 10,80 ± 3,22 * 17,31 ± 6,39 * 25,66 ± 4,72 * 50,47 ± 5,68 * 70,42 ± 8,28 ** 90,37 ± 6,49 n.s. 97,60 ± 5,30
0,00	3.700 = 3730

 $^{^{\}rm a}$ % de rosetas = (N°cél. positivas / N°cél. totales) x 100, considerando células positivas a las que presentan adheridos por lo menos 4 GRC.

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

Diferencias significativas tratado vs control:

^{*} p<0,005; ** p<0,01.

n.s.= no significativa

inhibitorio sobre la internalización de los eritrocitos, la CI50% debería ser menor en un ensayo de opsonoeritrofagocitosis lisar los eritrocitos adheridos. luego de Es importante destacar que en este caso no se observó una modificación importante de la $CI_{50\%}$ del extracto (29,32 μ g/ml) respecto al ensayo realizado en condiciones similares pero sin lisar los eritrocitos (27,98 µg/ml). Es decir el grado de inhibición de fagocitosis estaría estrictamente relacionado la de adherencia los eritrocitos más que que con la internalización de los mismos.

2.7.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre el metabolismo oxidativo de macrófagos peritoneales murinos

El amplio período de tiempo necesario para inducir el estado antifagocítico (Ver punto 2.4.) indica que el extracto no ejerce su efecto inhibitorio instantáneamente, lo cual disminuye la probabilidad de que su mecanismo de acción se efectúe a través del bloqueo de receptores a nivel de membrana celular. Así resulta más factible pensar la existencia de una alteración del metabolismo celular como consecuencia del tratamiento. Para corroborar esta posibilidad, analizó el efecto del tratamiento con distintas se concentraciones del extracto sobre el estallido respiratorio inducido por zimosán opsonizado (estímulo fagocítico) en los macrófagos. El metabolismo oxidativo de las células se evaluó mediante la técnica de reducción del NBT según se explicó en Materiales y Métodos, Sección 6.2.7.

Como se demuestra en el Cuadro 4, el tratamiento de las células con distintas concentraciones del extracto durante 24 h a 37°C produjo una inhibición dosis dependiente del metabolismo oxidativo de las mismas.

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

Los resultados obtenidos se exponen en el Cuadro 5. También en este caso, se pudo observar una inhibición significativa del metabolismo oxidativo en los cultivos tratados.

Cuadro 4

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

EL ESTALLIDO RESPIRATORIO INDUCIDO POR ZIMOSÁN EN MACRÓFAGOS

PERITONEALES MURINOS.

Concentración de extracto (mg/ml)	Porcentaje de células NBT+ ^a
0,25 0,12 0,10 0,05 0,03 0,00	2,08 ± 1,33 * 15,64 ± 5,30 * 18,42 ± 2,10 * 68,34 ± 4,20 ** 79,89 ± 8,58 (n.s.) 85,28 ± 2,30

Cultivos celulares que contenían 1×10^6 macrófagos fueron incubados durante 24 h en presencia de medio de cultivo (controles) o de distintas concentraciones de extracto en el mismo medio. Su metabolismo oxidativo fue evaluado por la técnica del NBT luego de agregar zimosán opsonizado.

a % cél. NBT+ = $(n^{\delta}$ cél. que redujeron NBT / n° cél. totales) x 100.

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

Diferencias significativas tratado vs control:

- * p<0,01; ** p<0,05.
- n.s.= no significativo.

Cuadro 5

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

EL ESTALLIDO RESPIRATORIO EN MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS

INDUCIDO POR PMA.

Concentración de extracto (mg/ml)	Porcentaje de células NBT+ ª
0,25 0,12 0,10 0,05 0,03 0,00	2,08 ± 1,33 * 15,64 ± 5,30 * 18,42 ± 2,10 * 68,34 ± 4,20 ** 79,89 ± 8,58 (n.s.) 85,28 ± 2,30

Cultivos celulares que contenían 1×10^6 macrófagos fueron incubados durante 24 h en presencia de medio de cultivo (controles) o de distintas concentraciones de extracto en el mismo medio. Su metabolismo oxidativo fue dosado por la técnica del NBT luego de estimular las células con PMA.

del NBT luego de estimular las células con PMA.

a % cél. NBT+ = (n° cél. que redujeron NBT / n° cél. totales) x 100.

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

Diferencias significativas tratado vs control:

- * p<0,01; ** p<0,05.
- n.s.= no significativo.

2.8.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre el consumo de glucosa de macrófagos peritoneales murinos

Con el fin de determinar si el tratamiento con el extracto provocaba una variación en el consumo de glucosa de los macrófagos murinos, se prepararon monocapas celulares en placas de 96 pocillos y se trataron durante 24 h (37°C, 5% CO₂) con las distintas concentraciones del extracto utilizadas en los ensayos de opsonoeritrofagocitosis (1,00 - 0,01 mg/ml). Pasado este tiempo se determinó la cantidad de glucosa presente en los sobrenadantes celulares. Los datos obtenidos se exponen en la Figura 5. Se observó una disminución significativa en consumo de glucosa por parte de los macrófagos tratados al emplear concentraciones del extracto de 1 y 2 mg/ml respecto a controles incubados en ausencia del extracto. Cabe destacar que el consumo de glucosa en ningún caso fue abolido en las células tratadas. Este resultado estaría indicando que el extracto de alguna forma es capaz de interferir con el metabolismo basal de las células tratadas, si bien dicho efecto no es muy marcado y sólo se manifiesta empleando altas concentraciones extracto.

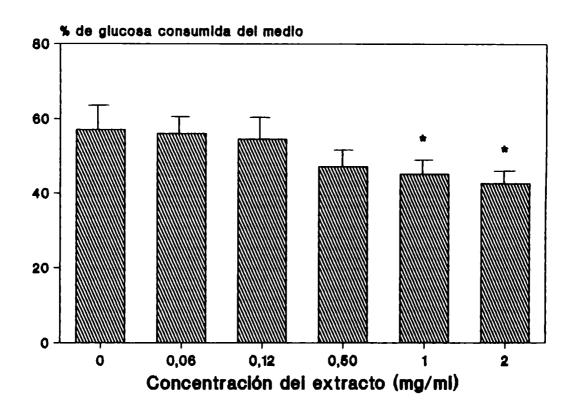


Figura 5: Efecto del extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre el consumo de glucosa por macrófagos peritoneales murinos.

Cultivos celulares que contenían 3 x 10⁵ macrófagos peritoneales murinos fueron incubados 24 h en presencia de distintas concentraciones del extracto en medio de cultivo. Veinticuatro horas más tarde se determinó la concentración de glucosa presente en los sobrenadantes. Comparando dichos valores con la concentración de glucosa presente en medio fresco se determinó el porcentaje de consumo de glucosa por parte de los cultivos

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

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

2.9.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la replicación de HSV-I en macrófagos peritoneales murinos

Con el fin de obtener mayor información sobre el estado metabólico de las células tratadas con el extracto, se decidió utilizar el virus HSV-I como marcador biológico (48, 49). Al el virus un parásito que requiere de la maquinaria biosintética celular para multiplicarse, una imposibilidad del virus para replicar en las células tratadas podría poner de manifiesto una posible alteración fisiológica de las mismas inducida por el extracto. Para responder a estos interrogantes establecieron cultivos se en monocapa de macrófagos peritoneales murinos y se trataron durante 24 h con distintas concentraciones del extracto (1,0 - 0,1 mg/ml) en medio de cultivo. Finalizada esta incubación se lavaron las monocapas y se infectaron con HSV-I con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/célula. A las 48 h post-infección cosecharon los sobrenadantes y se tituló el virus presentes en las mismas por plaqueo directo en células Vero.

Como se observa en la Figura 6, el tratamiento de los macrófagos con el extracto a concentraciones que inhiben la fagocitosis de partículas opsonizadas no provocó una disminución en la replicación del HSV-I.

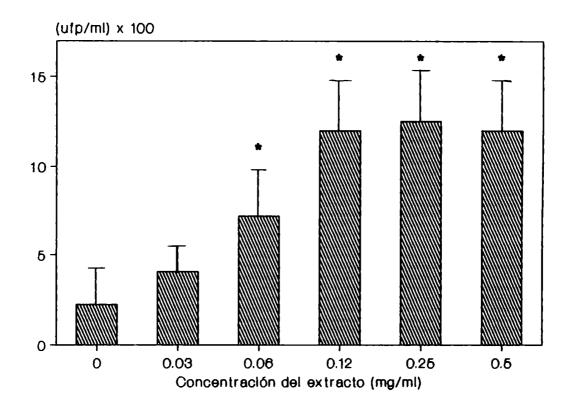


Figura 6: Efecto del extracto acuoso de hojas de *Trichilia* glabra sobre la replicación de virus Herpes en macrófagos peritoneales murinos.

Cultivos celulares que contenían 3 x 10⁵ macrófagos peritoneales murinos fueron incubados 24 h en presencia de distintas concentraciones del extracto en medio de cultivo. Veinticuatro horas más tarde los cultivos se infectaron con virus Herpes a una multiplicidad de infección de 0,1 UFP/cel. El virus producido se cosechó 24 h más tarde y se tituló por plaqueo directo.

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

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

Por el contrario se observó un aumento del rendimiento viral en las monocapas tratadas con las concentraciones más elevadas del extracto. Este aumento del rendimiento viral podría deberse a una disminución en la producción de interferón Ó por parte de las células tratadas o a una inhibición de los mecanismos lisosomales de destrucción de las partículas virales.

Este experimento pone de manifiesto que el extracto no inhibe en forma generalizada la actividad o la presencia de los receptores celulares de membrana como podría plantearse a partir de los experimentos de inhibición de la formación de rosetas ya que, a diferencia de lo observado con los receptores para Fc de IgG en los experimentos de rosetas, en el presente experimento el extracto parece no afectar la funcionalidad de los receptores involucrados en la adsorción del virus.

2.10.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la expresión de distintas moléculas en la membrana de macrófagos peritoneales murinos

Se estudió el efecto del extracto sobre la expresión de moléculas presentes en la membrana de macrófagos peritoneales murinos. Para tal fin se emplearon dos anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína que poseían distinta especificidad. El anticuerpo monoclonal OX6 es capaz de reconocer moléculas de clase II del Complejo Mayor de

Histocompatibilidad codificadas por la región I-A de los haplotipos k y s, mientras que el anticuerpo monoclonal 13/2 es capaz de reconocer la isoforma de 200 Kd del antígeno CD45. Este antígeno está constituído por un grupo de glicoproteínas de membrana con actividad de tirosina fosfatasa cuyos pesos moleculares oscilan entre 180 y 220 Kd. Dicho antígeno se expresa en leucocitos maduros e inmaduros, incluyendo células B y T, timocitos, PMN y fagocitos mononucleares (84).

Cultivos de macrófagos peritoneales de ratones C3H/Hej, H-2K 37°C con fueron incubados durante 24 h а medio de mantenimiento (controles) o distintas concentraciones del extracto (0,03 - 0,5 mg/ml) en el mismo medio. Una vez finalizada esta incubación las células se fijaron y se realizó inmunofluorscencia directa utilizando técnica de anticuerpos descriptos anteriormente. Se determinó el número de células fluorescentes en 20 campos y se compararon los valores de los cultivos tratados respecto a los controles sin tratar. Como puede verse en el Cuadro 6, el tratamiento produjo una reducción significativa en el número de células fluorescentes reveladas por el anticuerpo monoclonal OX6 en todas diluciones del extracto ensayadas (0,03 - 0,5 mg/ml). Por lo tanto se puede asegurar que el extracto afecta la expresión de los antígenos reconocidos por dicho anticuerpo. Por otro lado, en el mismo Cuadro puede observarse que el extracto no produjo modificación en el número de células fluorescentes cuando se reveló con el anticuerpo monoclonal 13/2. Esto indicaría, que

no todos los antígenos de membrana son afectados por el tratamiento con el extracto.

La disminución de antígenos I-A en la membrana de los macrófagos es interesante teniendo en cuenta el rol que cumplen estos antígenos en la respuesta inmune. Estos moléculas intervienen en la presentación antigénica que realizan los macrófagos y otras células presentadoras hacia las células T. Por lo tanto, una alteración en la presentación antigénica traería aparejada una concomitante disminución en la actividad de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune general, evidenciando 10 estaría una posible actividad que inmunosupresora del extracto.

Cuadro 6

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

LA EXPRESION DE ALGUNOS ANTIGENOS DE MEMBRANA DE MACRÓFAGOS

PERITONEALES MURINOS

Concentración de extracto	Número de célul	as positivas ^a
(mg/ml)	0 X 6	13/2
0,50 0,25 0,12 0,06 0,03 0,00	10 ± 4 * 21 ± 3 * 27 ± 6 * 30 ± 4 * 32 ± 5 * 64 ± 8	176 ± 28 n.s. 169 ± 14 n.s. 147 ± 25 n.s. 193 ± 18 n.s. 175 ± 26 n.s. 187 ± 22

Cultivos de macrófagos peritoneales de ratones C3H/Hej, (H2k) se trataron durante 24 h con medio de cultivo (control) o distintas concentraciones del extracto en el mismo medio. Una vez finalizado este período de tiempo, las células se lavaron, se fijaron y se sometieron a una inmunofluorescencia directa monoclonales utilizando dos anticuerpos distintos. anticuerpo OX6 reconece antigenos de histocompatibilidad de tipo II (I-A), mientras que el 13/2 reconoce los antígenos CD45 en la membrana de macrófagos. Las células se contaron al microscopio óptico a 1000 X utilizando una fuente de luz U.V.. Se determinó el número total de células fluorescentes por campo.

°° n° de células positivas en 20 campos.

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

^{*} p < 0.05

n.s. = no significativo.

3.- Efecto del extracto acuoso de hojas de *Trichilia*glabra sobre la capacidad fagocítica y el metabolismo oxidativo de PMN

Debido a que los PMN constituyen un grupo de células fagocíticas que desempeñan un papel importante en distintas respuestas inflamatorias, se quiso estudiar si el extracto era también activo sobre este tipo celular.

Teniendo en cuenta que estas células poseen una corta vida media "in vitro" se decidió trabajar con breves períodos de incubación (45 min) con el extracto.

Así, cultivos de CPA enriquecidas en PMN (proporción de PMN mayor del 90%) se obtuvieron como se indica en Materiales y Métodos, Sección 3.2.2. Dichos cultivos se incubaron durante 45 min en presencia de medio de crecimiento o distintas concentraciones 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 7, se obtuvieron diferencias significativas entre los cultivos control y los tratados durante 45 min con distintas concentraciones de extracto. Estos datos contrastan con los obtenidos para macrófagos donde eran necesarias al menos 3 h de incubación con el extracto

para observar una disminución significativa en el número de células fagocíticas en el ensayo de opsonoeritrofagocitosis.

4.- Efecto del extracto de *Trichilia glabra* sobre los linfocitos murinos

En vista a los resultados anteriores que indicaban la presencia en el extracto de una actividad inhibitoria sobre macrófagos y PMN, se quiso determinar si el extracto ejercía también algún efecto sobre los linfocitos B y T, células responsables de gran parte de las respuestas del sistema inmune.

4.1.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la capacidad proliferativa de linfocitos murinos

Para analizar el efecto del extracto sobre la proliferación linfocitos murinos, se establecieron cultivos de células obtenidas de bazo y ganglio de ratón los cuales fueron estimulados o no con distintos mitógenos, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto. Luego de 3 días de incubación, se cosecharon los cultivos y se cuantificó la proliferación resultante mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada al ADN celular descripto en Materiales y Métodos, en la Sección 6.3.1. 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.

En primer lugar se intentó determinar si el extracto ejercía algún efecto sobre la proliferación de células de bazo estimuladas con Concanavalina A (Con A). Este mítogeno induce preferencialmente la multiplicación de las células T. Para ello se obtuvo una suspensión de células de bazo tal como se describe en Materiales y Métodos, sección 3.3. Las células se incubaron durante 72 h con una concentración fija de Con A (4 µg/ml) en RPMI 10% de suero fetal (control) o distintas concentraciones del extracto (0,4 - 40 µg/ml) en el mismo medio (tratados). Una vez finalizada esta incubación se realizó un pulso de 18 h de timidina tritiada, luego de lo cual se cosecharon los cultivos cuantificándose la marca incorporada al ADN celular. Como se observa en el Cuadro 8 el extracto inhibió forma dosis significativamente y en una dependiente, proliferación inducida por el mitógeno. La concentración de extracto capaz de reducir al 50% la proliferación de células (C.I.50%) resultó de de bazo ser

Cuadro 8

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

LA PROLIFERACION DE CELULAS DE BAZO ESTIMULADAS CON

CONCANAVALINA A

	. 	
Concentración de extracto (µg/ml)	Tratamiento con 4 µg/ml de Con A	<pre>c.p.m. incorporadas a los cultivos .de linfocitos</pre>
40,0	+	296,85 ± 99,03 *
20,0	+	323,12 ± 76,11 *
10,0	+	697,19 ± 369,2 *
5,0	+	3869,43 ± 1595,4 *
2,5	+	4203,70 ± 197,5 *
1,0	+	40486,60 ± 2408,3 *
0,4	+	308064,82 ± 21984 **
0,0	+	459798,25 ± 27913
0,0	-	319,42 ± 157,5

 2×10^5 células de bazo fueron incubadas durante 72 h en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto con 4 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< 0,001; ** p < 0,005

0,53 µg/ml. Se quiso determinar si el extracto ejercía un efecto similar sobre la proliferación de linfocitos B presentes en la suspensión de bazo. Para ello, la suspensión celular se incubó a 37°C durante 72 h con 10 µg/ml de LPS (mitógeno que actúa preferencialmente sobre células B) en RPMI más 10% de suero fetal (control) y dos concentraciones del extracto (80 y 40 µg/ml) en el mismo medio (tratados). La proliferación celular se determinó como en el ensayo anterior. En la Figura 7 puede observarse que el tratamiento con el extracto inhibió significativamente la proliferación inducida por LPS en células de bazo en las dos concentraciones ensayadas.

Por último, con el fin de determinar si el extracto algún efecto sobre la proliferación de células linfoides provenientes de otros órganos se utilizaron ganglios poplíteos como fuente de la suspensión celular. Para ello, una suspensión de células de ganglio obtenida según se describe en Materiales y Métodos, en la sección 3.3. se incubaron durante 72 h a 37°C con 4 µg/ml de Con A en RPMI 10% de suero fetal (control) o distintas concentraciones del extracto (10 - 40 en el mismo medio (tratados). Los resultados presentan en el Cuadro 9 donde puede observarse que el extracto inhibió significativamente У de modo dosis

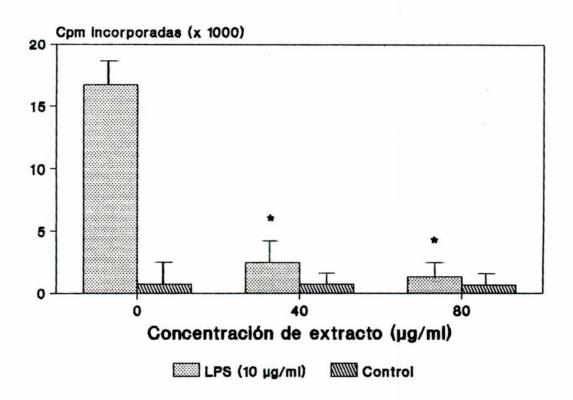


Figura 7: Efecto del extracto acuoso de hojas de *Trichilia* glabra sobre la proliferación de células de bazo murinas estimuladas con LPS.

 2×10^5 células de bazo fueron incubadas durante 72 h en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto con 10 µg/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

dependiente la proliferación celular en todas las concentraciones ensayadas.

Para cada uno de los ensayos se realizaron paralelamente cultivos control a los que se adicionó una dilución 1:10 del buffer con que se prepara el extracto. Dicho buffer no inhibió 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 Trichilia glabra. De los datos obtenidos en el Cuadro 8 se pudo obtener una concentración inhibitoria 50 % de 0,536 µg/ml.

Estos resultados se habían obtenido a partir de una suspensión celular no purificada, en la cuál además de linfocitos se encontraban otros tipos celulares, en particular macrófagos, los cuales intervienen en la proliferación de los linfocitos secretando monoquinas (64, 136). Teniendo en cuenta la reportada inhibición del extracto sobre los macrófagos podía ocurrir que el efecto antiproliferativo sobre los linfocitos fuera consecuencia directa del efecto del extracto sobre los macrófagos.

Con el fin de investigar esta posibilidad la suspensión de células de bazo fue incubada durante 1 h a 37°C en un caja de petri de plástico, recogiéndose el material no adherente una hora más tarde. Dicha suspensión se sometió a una segunda

Cuadro 9

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

LA PROLIFERACION DE CELULAS DE GANGLIO ESTIMULADAS CON

CONCANAVALINA A

Concentración de extracto (µg/ml)	Tratamiento con 4 µg/ml de Con A	<pre>C.p.m. incorporadas a los cultivos de linfocitos</pre>
40,0 20,0 10,0 0,0 0,0	+ + + +	366,18 ± 49,5 * 689,28 ± 215,7 * 994,09 ± 222,3 * 60983,50 ± 707,1 286,25 ± 103,8

 2×10^5 células de ganglio fueron incubadas durante 72 h en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto con 4 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

incubación en iguales condiciones. De esta manera se buscó eliminar de los cultivos las células adherentes, entre ellas macrófagos. Se determinó el número de macrófagos linfocitos en la suspensión por conteo al microscopio luego de una tinción diferencial con naranja de acridina (66). El promedio de linfocitos luego de evaluados 10 campos fue de 97 ± 8 antes de realizar el tratamiento de adherencia y de 103 ± 12 después de realizado. En el caso de los macrófagos el promedio bajó de 35 ± 4 células por campo a 10 ± 3 luego del ensayo de adherencia. Esta suspensión celular que contenía tres veces menos macrófagos que la original fue utilizada para realizar un ensayo de proliferación en presencia o ausencia del extracto. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 10. Como puede observarse, la proliferación celular estimulada por Con A resultó inhibida por el extracto a pesar de la disminución en la población de macrófagos. Por lo tanto, es probable que el extracto inhiba en forma directa la proliferación de los linfocitos, si bien no puede descartarse que una inmunosupresora del extracto sobre los macrófagos remanentes también aporte al efecto antiproliferativo detectado en la suspensión celular semipurificada.

Cuadro 10

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE TRICHILIA GLABRA SOBRE

LA PROLIFERACION DE UNA SUSPENSION SEMIPURIFICADA DE CELULAS DE

BAZO ESTIMULADAS CON CONCANAVALINA A

Concentración de extracto (µg/ml)	Tratamiento con 4 μg/ml de Con A	<pre>C.p.m. incorporadas a los cultivos de linfocitos</pre>
40,0	+	304,45 ± 83,21 *
20,0 10,0	+ +	456,37 ± 98,34 * 852,56 ± 85,36 *
5,0 2,5	+ +	4172,71 ± 263,2 * 5832,34 ± 434,2 *
1,0	+	38465,21 ± 1673, *
0,4 0,0	+ +	606734,45 ± 4287,3
0,0	-	589,78 ± 237,2

 2×10^5 células de bazo libres de adherentes fueron incubadas durante 72 h en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto con 4 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< 0,001 ; ** p < 0,005

4.2.- Toxicidad del extracto acuoso de Trichilia glabra 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.

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 distintas concentraciones de extracto (1-40 µg/ml) no se observó una disminución significativa de la viabilidad celular respecto de los controles.

Si relacionamos estos resultados con los expuestos en la Figura 7 y los Cuadros 8 y 9, podemos deducir que la incubación de células con el extracto no provocó la muerte celular aunque sí una alteración funcional que se evidencia por la inhibición

de la proliferación celular ante una estimulación con mitógenos.

4.3.- Efecto del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra 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.

Teniendo en cuenta los efectos antiproliferativos descriptos en 4.1. se consideró necesario estudiar con mayor profundidad los alcances de la alteración ejercida por el extracto sobre el metabolismo de los linfocitos. En particular se decidió evaluar la acción del extracto sobre la producción IFN gamma por parte de dichas células. Para ello se establecieron cultivos de células esplénicas de ratón las cuales se incubaron con 5 µg/ml de Con A en RPMI suplementado con 10% de suero fetal conteniendo distintas concentraciones de extracto (400, 40 y 4 µg/ml). Luego de 72 h de incubación se cosecharon los sobrenadantes titulándose los niveles de IFN presentes en los mismos. Los títulos de IFN se expresaron en dosis inhibitorias 50 % (DI_{50%}), 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 11 muestran que el tratamiento de las células con el extracto provocó una disminución significativa y dependiente de la dosis, de su capacidad de producir IFN. Mientras que los sobrenadantes de cultivos controles presentaron un título de 160 DI50%/ml 72 h después de iniciado el cultivo, en los tratados los títulos alcanzados siempre permanecieron a nivel basal (<10 DI50%/ml) a concentraciones de extracto de 400 y 40 µg/ml. Cuando la concentración de extracto en el medio de cultivo fue de 4 µg/ml la producción de IFN alcanzó niveles cercanos al del control sin extracto.

Cuadro 11

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO ACUOSO DE

TRICHILIA GLABRA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IFN GAMMA.

	Concentración del extracto (µg/ml			
	400	40	4	0
Título IFN (DI ₅₀ %/ml) a	<10	<10	100	160

Cultivos de células esplénicas inducidos con 5 μ g/ml de Con A fueron incubados en presencia o ausencia de distintas concentraciones de extracto. El sobrenadante se cosechó luego de 72 h de incubación y se dosó el IFN presente en el mismo.

a El título de IFN presente en el sobrenadante de los cultivos se expresó en DI₅₀%, siendo este índice 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: EXPERIMENTOS IN VIVO

1.- Estudio de la toxicidad "in vivo" de los extractos acuosos de T.glabra

Grupos de 20 animales recibieron una dosis diaria del extracto (0,2 ml; 4 mg/ml) por vía endovenosa con el objeto de determinar si el extracto producía un efecto tóxico sobre animales tratados. Como medida de toxicidad se estudió la variación del peso de los animales a lo largo de diez días de tratamiento. Es importante aclarar que ninguno de los tratamientos realizados con posterioridad implicaron más de 5 días de administración continua del extracto. Como se observa en la Figura 8 no se detectó variación en el peso de los animales tratados respecto de los controles durante el período que abarcó el tratamiento. Asimismo, cabe destacar que no se registraron cambios bruscos del comportamiento, síntomas de enfermedad o mortalidad en ninguno de los animales tratados, durante el tratamiento y en los dos meses posteriores al mismo.

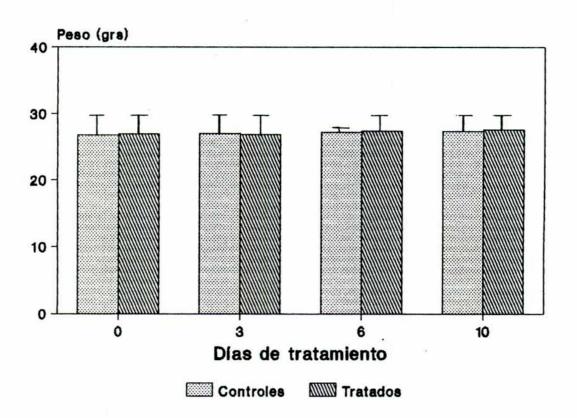


Figura 8: Toxicidad "in vivo" del extracto acuoso de T. glabra.

Grupos de 20 animales fueron inoculados por vía endovenosa con 0,4 mg del extracto de T. glabra en un volúmen de 0,1 ml de PBS (concentración = 4 mg/ml) (tratados) o igual volumen del diluyente (controles). El tratamiento se continuó durante 10 días consecutivos registrándose el peso de los animales diariamente a lo largo del mismo.

2.- Actividad anticomplementaria "in vivo"

Se estudió si el tratamiento de ratones con el extracto también producía algun efecto sobre la capacidad hemolítica del complemento tal como se observó previamente en los estudios "in vitro".

2.1.- Curva de dosis - respuesta

Grupos de 10 ratones cada uno fueron tratados con distintas concentraciones del extracto (4, 2 y 1 mg/ml) diluídas en PBS por vía e.v.. A las 12 h post-inoculación se exanguinaron los animales determinándose la capacidad hemolítica presente en los sueros. Como puede observarse en la Figura 9 se registró una inhibición de la actividad hemolítica del complemento tanto en la vía clásica como en la alterna. Este efecto es dosis dependiente y más pronunciado en la vía clásica que en la alterna.

2.2. - Cinética de la actividad anticomplementaria

A fin de determinar el tiempo de duración del efecto anticomplementario producido por el extracto, grupos de 10

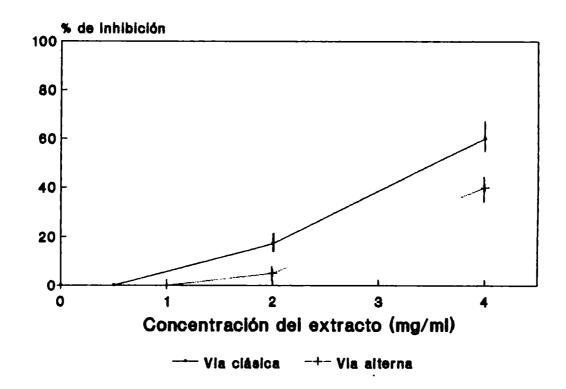


Figura 9: Efecto del tratamiento con extracto acuoso de T.glabra sobre la actividad hemolítica del suero del ratón. Curva dosis-respuesta.

Grupos de 10 animales fueron inoculados por vía endovenosa con 0,2 ml de distintas concentraciones del extracto (tratados) o con igual volumen de PBS (controles). A las 12 hs p.i. se exanguinaron los animales determinándose la actividad hemolítica de los sueros utilizando GRCo opsonizados (vía clásica) o sin opsonizar (vía alterna) como sistema indicador. El grado de hemólisis de las muestras se determinó por absorbancia a 541 nm.

El grado de inhibición de la capacidad hemolítica se calculó por la siguiente fórmula:

% de Inhibición = 100 - (% hemólisis tratados/controles).

ratones fueron tratados por vía endovenosa con una sola dosis del extracto de 0,8 mg en un volumen de 0,2 ml. Los animales se exanguinaron a distintos tiempos post-inoculación (12, 24, 48 y 72 h) determinándose la actividad hemolítica presente en los sueros. Los resultados se muestran en la Figura 10. Puede verse que el efecto anticomplementario no sólo es más pronunciado en la vía clásica sino que se mantiene durante más tiempo que en la alterna. Mientras que en esta última vía el efecto ya no se observa a las 48 h, en la clásica ésto ocurre recién 24 h más tarde.

3.- Efecto del tratamiento del extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la fagocitosis "in vivo"

Con el fin de determinar el efecto del extracto sobre la actividad del sistema retículo endotelial, grupos de 10 ratones fueron inoculados durante dos días consecutivos por vía endovenosa con una dosis diaria del extracto (0,8 mg de extracto en un volúmen de 0,2 ml). Seis horas después de administrarse la última dosis se realizó un ensayo de fagocitosis "in vivo". Para ello se administró a los animales una suspensión de carbón coloidal por vía endovenosa. Este material es fagocitado en forma inespecífica principalmente por los macrófagos presentes en el hígado y el bazo. Como

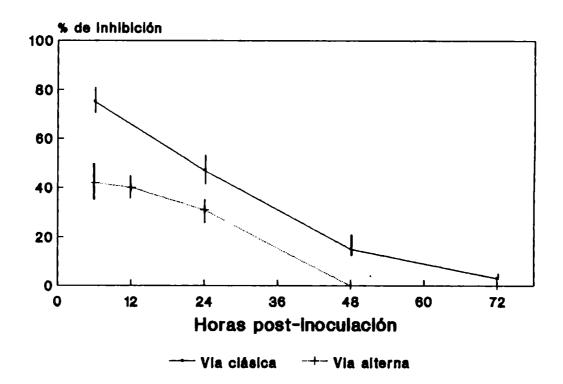


Figura 10: Efecto del tratamiento con extracto acuoso de T. glabra sobre la actividad hemolítica del suero del ratón. Cinética.

Grupos de 10 animales fueron inoculados por vía endovenosa con 0,2 ml de una dilución del extracto en PBS (concentración = 4 mg/ml) (tratados) o igual volumen del diluyente (controles). A distintos tiempos p.i. se exanguinaron los animales determinándose la actividad hemolítica de los sueros según se describió en la Figura 9.

resultado de esta actividad el carbón es eliminado de la sangre.

En la Figura 11 se observa que el tratamiento con el extracto no modificó la tasa de eliminación de carbón. Estos resultados concuerdan con la ausencia de un efecto inhibitorio del extracto sobre la fagocitosis inespecífica observada en los experimentos "in vitro".

4.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra sobre la producción de anticuerpos hemaglutinantes

Con el objeto de estudiar si el extracto inducía algún tipo de modificación sobre la respuesta inmune humoral, se investigó el efecto de distintos esquemas de tratamiento con dicho extracto sobre la producción anticuerpos de hemaglutinantes. Estudios previos habían establecido aue ratones adultos Balb/c inmunizados con 0,1 ml de una suspensión de GRC al 30% en PBS administrada por vía i.p. producían títulos máximos de anticuerpos hemaglutinantes entre el día +5 y el +7 postinmunización (p.i.). Por lo tanto, se decidió sangrar los animales el día +5 p.i. en todos los experimentos.

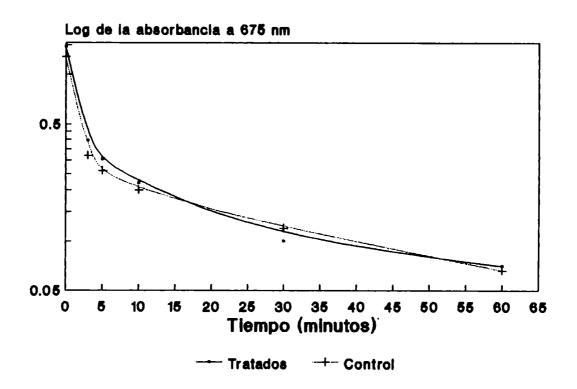


Figura 11: Efecto del extracto acuoso de T.glabra sobre la eliminación de carbón administrado por vía endovenosa

Grupos de 10 animales fueron inoculados durante dos días consecutivos por vía endovenosa con 0,1 ml de una dilución del extracto en PBS (concentración = 4 mg/ml) (tratados) o igual Seis volumen de diluyente (controles). horas después administrada la última dosis los animales recibieron 0,2 ml de una suspensión al 1% de carbón coloidal por vía e.v. A distintos tiempos postinoculación se extrajeron 20 µl de sangre de cada animal, y se lisaron los eritrocitos en 2 ml de H2O destilada, leyéndose las muestras así obtenidas a 675 nm. Con los datos obtenidos de los animales controles tratados se realizó un gráfico de logaritmo de la absorbancia en función del tiempo. La tasa de eliminación del carbón en sangre por acción del sistema retículo endotelial surge de calcular la pendiente de las curvas así obtenidas.

evaluar el efecto de los extractos sobre la producción de anticuerpos hemaglutinantes, se dispuso de grupos de 10 animales sometidos a distintos tratamientos y vías de inoculación del extracto según se detalló en Materiales y Métodos, en la Sección 7.3.1. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12. Sólo se observaron diferencias significativas entre los animales control (inoculados con PBS) y los tratados con 4,0 mg/ml de extracto (máxima concentración la vía de inoculación utilizada ensayada) cuando intragástrica. Con ninguno de los otros esquemas ensayados se observó una disminución significativa en el título de anticuerpos hemaglutinantes.

5.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de Trichilia glabra sobre la respuesta de inflamación inmediata

Teniendo en cuenta los efectos inhibitorios ejercidos por el extracto sobre la actividad del complemento y el metabolismo de los PMN, se decidió evaluar su efectividad en un modelo experimental "in vivo" que pusiera en evidencia este aspecto de la respuesta inmune. Para ello se eligió la reacción de inflamación inmediata, fenómeno en el cual están implicados el

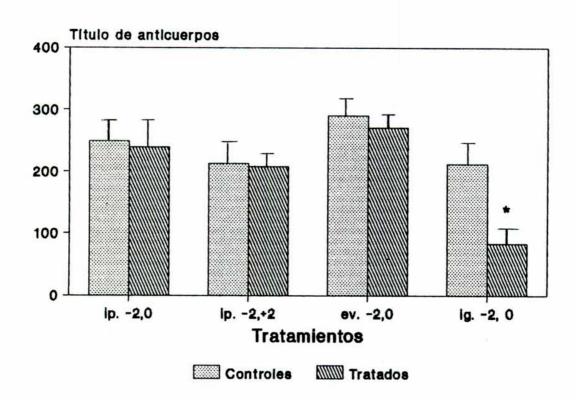


Figura 12: Efecto del extracto acuoso de *T.glabra* sobre la producción de anticuerpos hemaglutinantes

Grupos de 10 animales inmunizados con una suspensión de GRC al 30% en PBS, fueron inoculados con una dilución al décimo del extracto en PBS (concentración: 4 mg/ml) (tratados) o el diluyente (controles). Los animales sólo recibieron una dosis diaria del extracto independientemente de la duración del tratamiento realizado (-2,0 o -2,+2). El volumen de extracto inoculado fue de 0,5 ml para las inoculaciones por vía intraperitoneal (i.p.), de 0,1 ml para la vía endovenosa (e.v.) y de 0,2 ml para la vía intragástrica (i.g.). A los 5 días postinmunización los animales se sangraron a blanco y se tituló la presencia de anticuerpos hemaglutinantes en suero.

Se considera día 0 al día de inmunización.

El título expresado se calculó como la inversa de la máxima dilución de suero que producía hemaglutinación completa.

complemento y los PMN (132). En este modelo se mide la inflamación inducida en la almohadilla plantar del ratón después de una inoculación subcutánea de una suspensión de zimosán. Se considera tiempo 0 al momento de la inducción.

Los animales fueron inoculados por vía endovenosa con 0,1 ml de distintas concentraciones del extracto (tratados) o igual volumen de PBS (controles). Esta dosis fue administrada a las 6 y 3 h preinducción. Los animales fueron inoculados al tiempo 0 en la almohadilla plantar derecha con una suspensión de zimosán en PBS. A las 6 h postinducción se midió con un calibre de precisión la hinchazón de dicha almohadilla plantar respecto de la izquierda como forma de cuantificar la intensidad de la respuesta inflamatoria desencadenada. Los datos se graficaron como: % de inhibición respecto del control= [hinchazón promedio la almohadilla (en de plantar tratados/hinchazón promedio (en mm) de la almohadilla plantar en animales controll x 100.

Como se observa en la Figura 13, el tratamiento con el extracto redujo significativamente y de una manera dependiente de la concentración ensayada, la inflamación inducida por zimosán.

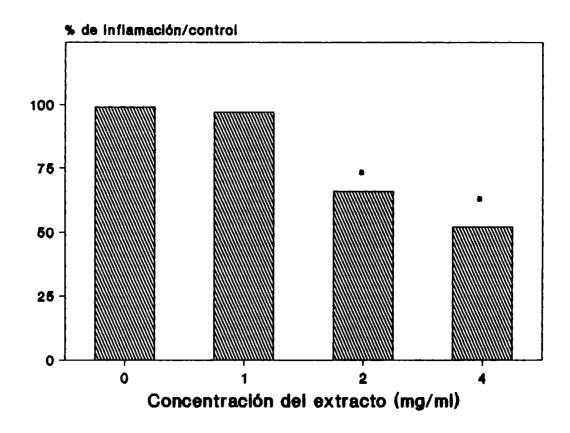


Figura 13: Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre la respuesta de inflamación inmediata

Grupos de 10 animales fueron inoculados por vía endovenosa con 0,1 ml de distintas concentraciones del extracto (tratados) o iqual volumen de PBS (controles). Esta dosis fue administrada a las 6 y 3 h preinducción. Los animales fueron inoculados al tiempo 0 en la almohadilla plantar derecha con una suspensión de zimosán en PBS. A las 6 h postinducción se midió con un calibre de precisión la hinchazón de dicha almohadilla plantar de izquierda forma de cuantificar respecto la como intensidad de la respuesta inflamatoria desencadenada. Los datos se expresaron como % de inflamación respecto del control= [hinchazón promedio (en mm) de la almohadilla plantar animales tratados/ hinchazón promedio (en mm) de la almohadilla plantar en animales control] x 100.

a p < 0,05.

6.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de Trichilia glabra sobre algunos aspectos de la respuesta inmune celular mediados por células T

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 ensayos 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.

6.1. - Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por GRC

Con el fin de desarrollar una respuesta de hipersensibilidad retardada en los ratones, dichos animales fueron fueron sensibilizados por vía i.p. con una suspensión de GRC (dia 0). Siete días más tarde, los animales fueron desafiados 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.

Para estudiar el efecto del extracto sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada, grupos de 10 ratones inoculados por vía 0,1 endovenosa con ml de distintas concentraciones del extracto (tratados) o igual volumen de PBS (controles) según dos esquemas diferentes. Los animales recibieron una dosis diaria del extracto (o PBS) los días -2 al O (tratamiento durante la fase de inducción de la respuesta) o al +7 (tratamiento días +4 durante la fase desencadenamiento de la respuesta). Como en el caso de los experimentos de inflamación inmediata, los datos se expresaron como % de Inflamación respecto del control.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 14. La supresión de la respuesta fue altamente significativa cuando el extracto fue inoculado durante cualquiera de las dos fases principales de la reacción: días -2 al 0 (sensibilización) o dias +4 al +7 (desencadenamiento). Es interesante destacar que administrado la fase cuando el extracto fue en de desencadenamiento de la reacción, el efecto inhibitorio fue más importante que cuando se administró alrededor del momento de sensibilización de la respuesta de HSR.

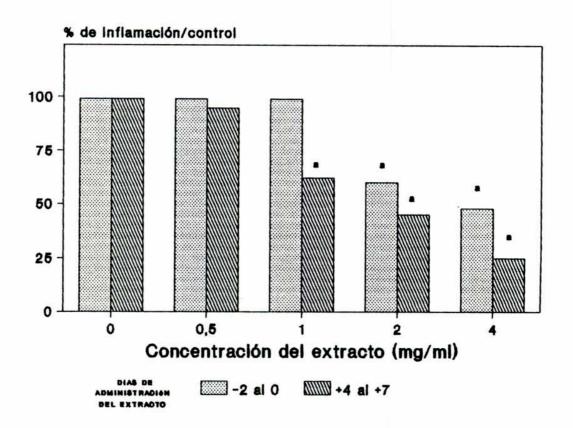


Figura 14: Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada (HSR)

Con el fin de estudiar el efecto del extracto sobre la respuesta de HSR, grupos de 10 animales fueron inoculados por vía endovenosa con 0,1 ml de distintas concentraciones del extracto siguiendo el esquema indicado en cada caso (tratados) o igual volumen del diluyente (controles). Para desarrollar la respuesta de HSR los ratones se inocularon por vía ip con 0,2 ml de una suspensión celular que contenía 1 x 10⁶ GRC (día 0). Los mismos animales recibieron, siete días más tarde (día + 7), 0,05 ml de una suspensión de GRC conteniendo 1 x 10⁸ células, por vía subcutánea en la almohadilla plantar derecha mientras que la izquierda recibió igual volumen de PBS. A las 24 h postinducción se cuantificó el grado de inflamación como se describió en la Figura 13.

a p < 0,05.

6.2.- Efecto del tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* sobre la reacción de injerto contra huésped

Para evaluar el efecto del tratamiento con el extracto sobre el nivel de respuesta mediada por células T frente a antígenos de histocompatibilidad extraños, se empleó el ensayo local de Ford y Simonsen (58).

este experimentos, se desencadenaron grupo de reacciones de injerto contra huésped locales en híbridos F1 (Balb/c $[H-2^k]$ x AKR/J $[H-2^d]$) por adultos inoculación subcutánea, en la almohadilla plantar derecha de una suspensión de esplenocitos provenientes de individuos de la cepa parental Balb/c y en la almohadilla izquierda una suspensión de células singeneícas. La reacción se cuantifica determinando el aumento de peso que se produce en el ganglio popliteo derecho comparándolo con el peso del ganglio que drena la almohadilla izquierda. Los animales recibieron inmediatamente plantar después de la invección de las células 0,1 ml de la máxima concentración del extracto empleada para todas las pruebas "in vivo" (4 mg/ml) (grupo tratado) o 0,1 ml de PBS (grupo control) por vía ev. Siete días más tarde se extrajeron los ganglios poplíteos y se pesaron en una balanza de precisión con vistas a determinar la magnitud de la reacción de inflamación local

inducida por la inyección de las células parentales según se detalla en Materiales y Métodos, en la sección 7.4.1.

El peso promedio de los ganglios de los animales tratados (1,68 ± 1,10) no presentó diferencias significativas respecto al peso promedio de los ganglios de los controles (2,86 ± 1,66). Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento de los híbridos F1 adultos con el extracto por vía ev. fue incapaz de disminuir significativamente la magnitud de la reacción de injerto contra huésped desencadenada con esplenocitos Balb/c adultos. Cabe aclarar que estos datos se obtuvieron empleando una única dosis del extracto simultáneamente con la inoculación de los esplenocitos. No puede descartarse que tratamientos distintos al ensayado modifiquen de alguna manera la respuesta estudiada. Por lo tanto, es prematuro aún asegurar que el extracto no ejerce ningún efecto sobre este tipo de respuesta.

PARTE III: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS

ACTIVIDADES PRESENTES EN EL EXTRACTO ACUOSO

DE TRICHILIA GLABRA.

1.- Características del extracto crudo

El extracto acuoso de hojas de *Trichilia glabra* presentó una concentración de 40 mg/ml determinada por peso seco. La concentración de proteínas determinada por Bradford fue de 0,125 mg/ml y la concentración de azúcares según el método del fenol-sulfúrico fue de 0,62 mg/ml.

2.- Ensayos realizados para la caracterización de los principios activos antifagocítico y anticomplementarios presentes en el extracto acuoso de Trichilia glabra

Con el fin de caracterizar los principios activos presentes en el extracto acuoso de hojas de *T.glabra*, se realizaron distintos ensayos sobre el extracto que involucraron la diálisis, el calentamiento y el tratamiento con ácidos y álcalis. Se evaluaron las actividades antifagocíticas y anticomplementarias de cada fracción según los protocolos detallados en Materiales y Métodos, en la Sección 6.

2.1- Diálisis

La diálisis del extracto crudo contra agua destilada determinó la pérdida de la actividad antifagocítica del mismo (Cuadro 12). De acuerdo a estos datos el principio activo antifagocítico tendría un PM < a 10,000 D (el tamaño de corte de la bolsa de diálisis). Para descartar que el principio antifagocítico fuera una molécula de alto PM que precisara de un cofactor de bajo PM que se perdiera durante la diálisis, se decidió realizar una diálisis reversa (Materiales y Métodos, Sección 9.2.1). En este caso la actividad total se encontró en la fracción presente en el interior de la bolsa de diálisis (PM <10,000 D).

Por otro lado, la actividad anticomplementaria permaneció en en el interior de la bolsa de diálisis (PM > 10,000 D) al realizar una diálisis clásica, mientras que no se registró actividad alguna en la fracción del dializado reverso. De este modo se pudieron separar las actividades antifagocítica y anticomplementaria en dos fracciones de alto y bajo PM respectivamente.

Cuadro 12:

ACTIVIDADES BIOLOGICAS PRESENTES EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE

LA DIALISIS DEL EXTRACTO ACUOSO DE TRÍCHILIA GLABRA

	Concentraci	ón inhibitoria 5	0 %
Fracciones			
Actividad	Dializado	Dializado reverso	Extracto crudo
Anticompl.	2,45 mg/ml	N.D	2,50 mg/ml
Antifagocit.	N.D.	0,025 mg/ml	0,027 mg/ml
Antimitog.	N.D.	0,56 μg/ml	0,530 μg/ml

- El extracto acuoso de **T.glabra** se sometió a diálisis frente a agua destilada (diálisis clásica) o bien una bolsa de diálisis conteniendo 10 ml de agua destilada se introdujo en 200 ml de extracto para obtener, luego de producida la difusión, una fracción de bajo peso molecular en el interior de la bolsa de diálisis (diálisis reversa).
- a Se evaluó la actividad de las fracciones retenidas en el interior de las bolsas de diálisis. Tamaño de corte de la membrana de diálisis = 10,000 dalton.

Las actividades se expresaron en CI50%.

- b La actividad antifagocítica se determinó según se detalla en la Sección 6.2. de Materiales y Métodos.
- C La actividad anticomplementaria se estudió en la vía clásica según se detalla en la Sección 6.1. de Materiales y Métodos.
- d La actividad antimitogénica se determinó según se detalla en la Sección 6.3 de Materiales y Métodos.

N.D.: No detectado

Por otro lado, se determinó la concentración de proteínas, azúcares y la concentración en peso seco del dializado y el dializado reverso. Los datos se presentan en Cuadro 13.

Es interesante destacar que la baja concentración de proteínas presentes en la fracción dializada puede deberse al hecho de que las mismas se hayan desnaturalizado durante la diálisis, ya que al finalizar ésta se observó material precipitado en el interior de la bolsita de diálisis el cual fue eliminado por centrifugación.

2.2. - Estabilidad térmica de los principios activos

Distintas alícuotas del extracto crudo se incubaron durante dos horas a distintas temperaturas: 40, 60, 80 y 100° C. Como se observa en la Figura 15 no se observó una disminución significativa en las CI_{50%} de las actividades estudiadas a ninguna de las temperaturas utilizadas lo que implicaría que los principios activos serían termoestables.

Cuadro 13

CARACTERÍSTICAS BIOQUIMICAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA

DIALISIS DEL EXTRACTO ACUOSO DE TRICHILIA GLABRA

Concentración			
Fracción	Peso seco ^a	Proteinas ^b	Azúcares ^C
Dializado	12,30 mg/ml	0,04 mg/ml	0,18 mg/ml
Dializado Reverso	40,50 mg/ml	0,02 mg/ml	0,87 mg/ml
Extracto crudo	40,02 mg/ml	0,125 mg/ml	0,62 mg/ml

 $^{^{\}rm a}$ Para determinar el peso seco 400 µl de cada fracción se evaporaron a presión reducida, determinándose el peso del material remanente.

material remanente.

b La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

C La concentración de azúcares se determinó por el método del fenol-sulfúrico.

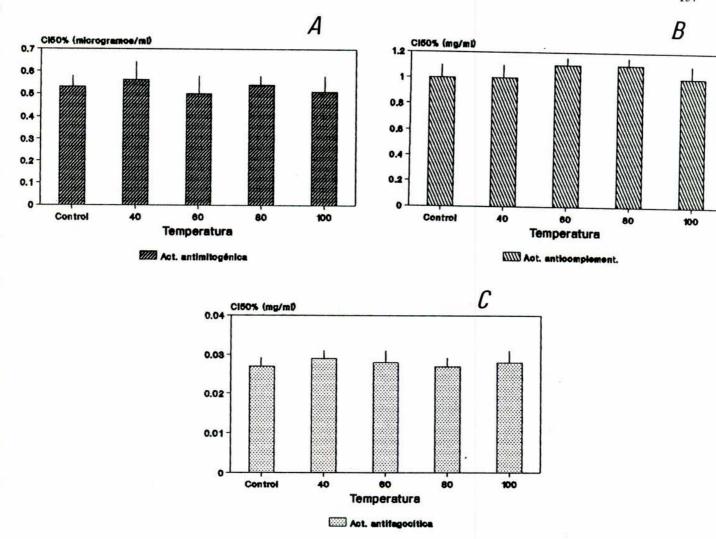


Figura 15: Efecto del calentamiento a distintas temperaturas sobre las actividades presentes en el extracto acuoso de T. glabra

El extracto acuoso de **T.glabra** se incubó a distintas temperaturas durante 2 h con el fin de estudiar la estabilidad térmica de las actividades presentes en el mismo.

Finalizada dicha incubación se determinaron las actividades antimitogénicas (A), anticomplementaria (B) y antifagocítica (C).

Las actividades se expresaron en CI50%.

La actividad antifagocítica se determinó según se detalla en la Sección 6.2. de Materiales y Métodos.

La actividad anticomplementaria se estudió en la vía clásica según se detalla en la Sección 6.1. de Materiales y Métodos.

La actividad antimitogénica se determinó según se detalla en la Sección 6.3 de Materiales y Métodos.

2.3. - Tratamiento con proteasas

Distintas alícuotas del extracto crudo fueron incubadas con tripsina (concentración final de enzima en la mezcla de reacción= 20, 10 y 5 mg/ml) o proteinasa K (concentración final de enzima en la mezcla de reacción= 0,2; 0,1 y 0,01 mg/ml). Luego de la incubación las enzimas se inactivaron por calentamiento a ebullición (y posterior agregado de suero bovino, en el caso de la tripsina, para frenar la posible actividad enzimática remanente). Cabe destacar que concentraciones de enzimas en el medio de incubación de las células resultó ser no tóxica y que los controles con enzimas en ausencia de extracto no afectaron la actividad fagocítica de los macrófagos. Como se observa en el Cuadro 14 el tratamiento con tripsina no produjo ninguna modificación de las actividades presentes en el extracto, mientras que la Proteinasa K inhibe de una manera dosis dependiente la actividad antifagocítica presente en el extracto. Este dato estaría indicando que el activo antifagocítico tendría una naturaleza principio Si bien la actividad anticomplementaria proteica. ν antimitogénica no se ven modificadas sería necesario realizar ensayos con otras enzimas para confirmar si dichas actividades son o no sensibles a la acción de proteasas.

Cuadro 14

SENSIBILIDAD DE LAS ACTIVIDADES PRESENTES EN EL EXTRACTO ACUOSO

DE T.GLABRA FRENTE AL TRATAMIENTO CON PROTEASAS

	Concen	tración inhibit	oria 50%ª
Conc. de enzima	Actividad Antifag.	Actividad Anticompl.	Actividad Antimitog.
Tripsina			
20 mg/ml	0,030 mg/ml	2,39 mg/ml	0,56 μg/ml
10 mg/ml	0,025 mg/ml	2,40 mg/ml	0,60 µg/ml
5 mg/ml	0,029 mg/ml	2,30 mg/ml	0,55 μg/ml
0 mg/ml	0,027 mg/ml	2,50 mg/ml	0,53 μg/ml
Proteinasa K			
0,2 mg/ml	> 4,00 mg/ml	2,48 mg/ml	0,58 μg/ml
0,1 mg/ml	1,20 mg/ml	2,37 mg/ml	0,47 μg/ml
0,01 mg/ml	0,20 mg/ml	2,41 mg/ml	0,48 µg/ml
0 mg/ml	0,027 mg/ml	2,50 mg/ml	0,53 μg/ml

El extracto acuoso de T.glabra se incubó a 37°C durante 2 h con distintas concentraciones de las enzimas. Se calentaron las muestras a ebullición 30 min, y luego se determinaron las actividades presentes.

aLas actividades se expresaron en CI50% como se describe en el Cuadro 12.

2.4. - Sensibilidad al agregado de ácidos y álcalis

Distintas alícuotas del extracto crudo se llevaron a pH 9 o 3 por agregado de NaOH (1 M) o HCl (1 N). Las muestras se incubaron 1 h a temperatura ambiente y luego se llevaron a la neutralidad. demuestra Conto se en el cuadro 15, los tratamientos produjeron una inhibición total de la actividad antifagocítica presente en el extracto, sin afectar actividad anticomplementaria. Por otro lado, la actividad antimitogénica se vio afectada de manera dispar por tratamientos, siendo más sensible al alcalí que al ácido.

2.5.- Precipitación con alcoholes

Alícuotas del extracto crudo se mezclaron con 4 volúmenes de etanol o isopropanol. El material insoluble se separó de la solución por centrifugación y se resuspendió en agua destilada llevándolo al volumen original de extracto. El material hidroalcohólico se evaporó a presión reducida y también se resuspendió en agua destilada al volumen original de extracto. Como puede observarse en el Cuadro 16 las actividades antifagocíticas y antimitogénicas permanecieron en solución mientras que la actividad anticomplementaria se recuperó en las fracciones precipitadas. No se observaron diferencias en las actividades totales entre los dos tratamientos.

Cuadro 15

SENSIBILIDAD DE LAS ACTIVIDADES PRESENTES EN EL EXTRACTO ACUOSO

DE T.GLABRA FRENTE AL TRATAMIENTO CON ACIDOS Y BASES

	C	oncentración inhi	bitoria 50% a
Tratamiento	Actividad Antifag.	Actividad Anticompl.	Actividad Antimitog.
Acido (pH=3)	N.D.	2,4 mg/ml	43 μg/ml
Básico (pH=10)	N.D.	2,5 mg/ml	386 µg/ml
Neutro (pH=7)	0,027 mg/ml	2,5 mg/ml	0,536 μg/ml

El extracto acuoso de T.glabra se llevó a pH = 10 o 3 por agregado de NaOH (1 M) o HCl (1M) respectivamente. Luego de una incubación a 37°C durante 2 h se neutralizaron las muestras determinándose las actividades presentes. Se realizó un control a pH 7.

a Las actividades se expresaron en CI_{50%} como se describe en el Cuadro 12.

N.D.: No detectado.

Por otro lado, se determinaron las concentraciones de proteínas y azúcares y la concentración en peso seco de las distintas fracciones. Los datos se presentan en el Cuadro 17.

Cabe destacar que una cierta cantidad de permaneció insoluble luego de la precipitación y resuspensión lo que justifica que la suma de los pesos secos del material presente en el precipitado y el sobrenadante en ambos tratamientos, fuera menor al peso seco total del material de partida. Esto podría explicar también la baja cantidad de proteínas encontradas en las distintas fracciones luego del tratamiento con los alcoholes. Comparando los Cuadros 15 y 16 pueden obtenerse los valores de las actividades específicas (A.E.) de las distintas fracciones. En particular para la actividad anticomplementaria las distintas A.E. fueron de: 0,06 $DI_{50\%}/mg$ para el extracto crudo y de 0,49 $DI_{50\%}/mg$ y 0,39 DI50%/mg en las fracciones precipitadas por los tratamientos con etanol e isopropanol respectivamente. Por teniendo en vista una purificación del principio anticomplementario este paso de precipitación sería una buena que según estos datos, el indice debido opción а purificación estaría próximo a 10.

Cuadro 16

ACTIVIDADES BIOLOGICAS PRESENTES EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE

LA PRECIPITACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE TRICHILIA GLABRA CON

ETANOL E ISOPROPANOL

		Concentración inh	ibitoria 50%ª
Fracción	Actividad Antifag.	Actividad Anticompl.	
ETANOL			
Ppdo.	N.D.	2,40 mg/ml	N.D.
Sbnte.	0,029 mg/ml	N.D.	0,53 μg/ml
ISOPROPANOL			
Ppdo.	N.D.	2,40 mg/ml	N.D.
Sbnte.	0,025 mg/ml	N.D.	0,53 μg/ml
EXTRACTO CRUDO	0,027 mg/ml	2,50 mg/ml	0,53 μg/ml

El extracto acuoso de T.glabra se mezcló con 4 volúmenes de etanol o de isopropanol en frío. El material insoluble se separó por centrifugación a 10,000 x g. El material precipitado se resuspendió en agua destilada.

El sobrenadante de los tratamientos se evaporó a presión reducida y el material obtenido se resuspendió en agua destilada.

En todos los casos el material a resuspender se llevó al volumen original de la alícuota de extracto crudo utilizada en los tratamientos.

aLas actividades se expresaron en CI50% como se detalla en el Cuadro 12.

N.D.: No detectado.

CUADRO 17

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA PRECIPITACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE TRICHILIA GLABRA CON ETANOL E ISOPROPANOL

	Concentración			
Fracción	Peso seco ^a	Proteinas b	Azúcares ^C	
ETANOL				
Precipitado	5,5 mg/ml	0,08 mg/ml	0,15 mg/ml	
Sobrenadante	23,66 mg/ml	0,06 mg/ml	0,50 mg/ml	
ISOPROPANOL				
Precipitado	6,4 mg/ml	0,05 mg/ml	0,10 mg/ml	
Sobrenadante	17,05 mg/ml	0,018 mg/ml	0,47 mg/ml	
EXTRACTO CRUDO	40,00 mg/ml	0,12 mg/ml	0,62 mg/ml	

 $^{^{\}rm a}$ Para determinar el peso seco 400 µl de cada fracción se evaporaron a presión reducida, determinándose el peso del material remanente.

material remanente.

b La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

C La concentración de azúcares se determinó por el método del fenol-sulfúrico.

2.6. - Cromatografía de filtración molecular del extracto crudo en columna de Sephadex G-50

Una alícuota del extracto crudo se comatografió en una columna de Sephadex G-50, utilizando PBS como buffer de determinó elución. Se la actividad antifagocítica У anticomplementaria de las fracciones recogidas, así como su concentración de proteínas y azúcares. Como se observa en la Figura 16, la actividad anticomplementaria fue eluída en el volumen muerto de la columna, confirmando que el principio activo tendría un alto PM como ya se había visto durante los experimentos de diálisis. Asimismo, cabe destacar que el pico actividad anticomplementaria comigró con un pico azúcares.

lado, las actividades antifagocítica Por otro У en eluyeron asociadas dos picos de PMantimitogénica aproximados de: 10,500 y 2,500 D según se determinó por comparación con marcadores de PM corridos en dicha columna en las mismas condiciones (Figura 17).

Por último, cabe destacar que ninguna de las actividades estudiadas comigró con algún pico de proteínas.

Este dato es interesante teniendo en cuenta la sensibilidad de la actividad antifagocítica frente a la proteinasa K.

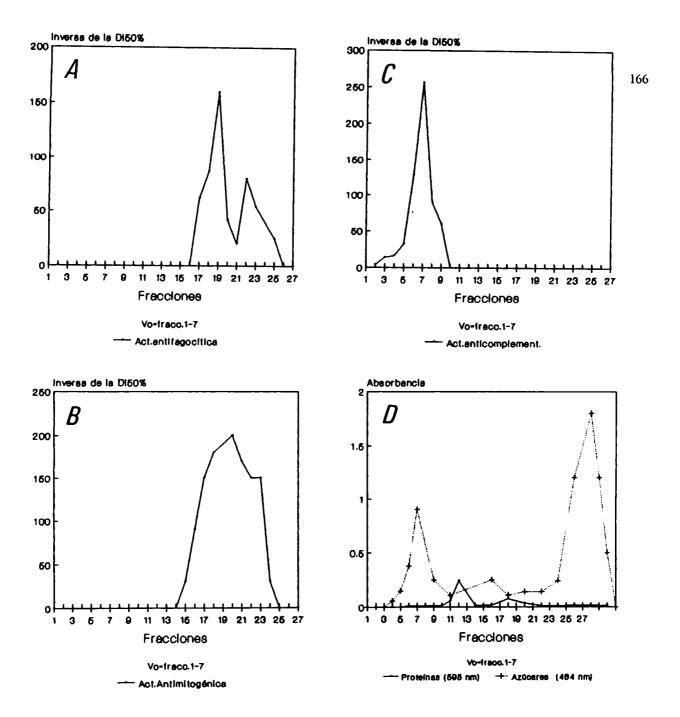


Figura 16: Cromatografía en columna de Sephadex G-50 del extracto crudo de T.glabra

Una alícuota de 1 ml de extracto crudo se sembró en una columna de Sephadex G-50 de 50 ml de volumen total equilibrada en PBS. La columna se eluyó con el mismo buffer recogiéndose fracciones de 3 ml cada una. Se determinaron las actividades antifagocíticas (A), antimitogénicas (B) y anticomplementarias (C) presentes en las fracciones según se detalla en la Figura 15.

Asimismo, a cada fracción se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y la concentración de azúcares por el método del fenol-sufúrico (D).

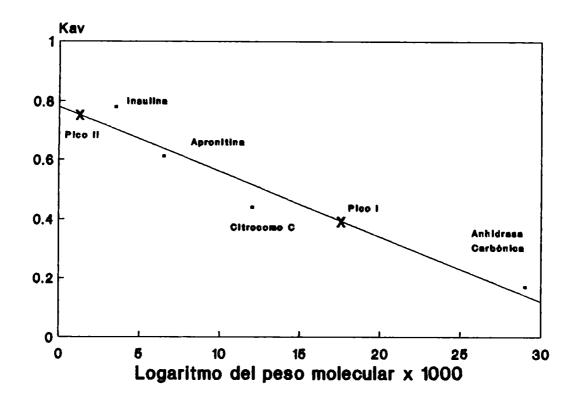


Figura 17: Determinación de los PM de los picos de actividad antifagocítica y antimitogénica obtenidos por cromatografía de filtración molecular en columna de G-50

Para la calibración de la columna se utilizaron siguientes patrones de PM: Apronitina (6,5 x 10³ D), Citocromo C $(1,2 \times 10^4 \text{ D})$ y Anhidrasa carbónica $(2,9 \times 10^4 \text{ D})$. Todas estas proteínas se detectaron en las fracciones eluídas por el método de Bradford. molecular El peso aproximado fracciones activas se estimó de un gráfico del PM en función Kav obtenido a partir de las sustancias marcadoras empleadas. El Kav se define como la relación: (Ve - Vo) / (Vt -Vo), donde Ve: volumen de elución de la sustancia; Vo: volumen de exclusión de la columna y Vt: volumen total de la columna.

El volumen total y el volumen muerto de la columna se determinaron utilizando azul Dextrán y cloruro de cobalto.

Los motivos por los cuales no se detecten proteínas en el pico de actividad antifagocítica podrían radicar en la ausencia de aminoácidos básicos en dicho principio, por lo cual no sería detectado por Bradford (límite de sensibilidad: 0,1 µg/ml). Podría ocurrir asimismo que la concentración proteíca en dicho pico sea inferior a los niveles detectables por el ensayo.

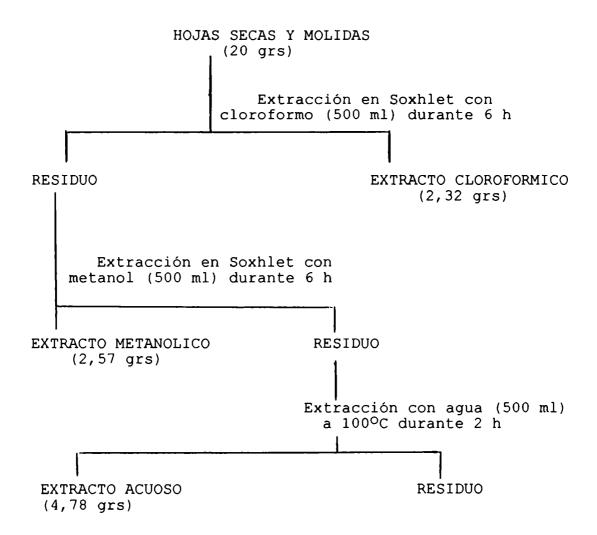
PARTE IV: PURIFICACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS PRESENTES EN HOJAS VERDES DE TRICHILIA GLABRA

Teniendo en cuenta los datos obtenidos durante la caracterización bioquímica de los principios activos, en termoestabilidad de los mismos y PM particular la sus aproximados, se decidió realizar un esquema de purificación partiendo del material vegetal seco y pulverizado. Este tipo de esquema permite un aumento del rendimiento en la obtención de los principios activos, así como una extracción secuencial de los mismos.

1.- Extracción del material vegetal con distintos solventes

Las hojas de *Trichilia glabra* fueron desecadas en horno a 60°C y luego fueron pulverizadas para obtener el material que sirvió de punto de partida para la purificación. Al polvo así obtenido se lo sometió a sucesivas extracciones continuas en Soxhlet utilizando cloroformo, metanol y agua según se presenta en el Esquema I.

Esquema 1: Extracción del material vegetal empleando distintos solventes por el método de extracción continua en Soxhlet



Cuadro 18

ACTIVIDADES BIOLOGICAS PRESENTES EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE

LA EXTRACCION CON DISTINTOS SOLVENTES DEL MATERIAL VEGETAL EN
POLVO

	Dosis inhibitorias 50 % a		
Fracción	Actividad ^b Antifag.	Actividad Anticompl.	Actividad Antimitog.
Clorofórmica	0	0	0
Metanólica	256	0	105
Acuosa	0	128	0

Las fracciones se evaporaron a presión reducida y se resuspendieron en agua destilada para determinar su actividad.

b La actividades se determinaron según se detalla en el Cuadro 12

a Las actividades se expresaron en dosis inhibitorias 50 % $(DI_{50\%})$ = inversa de la máxima dilución en la cual se observa al menos el 50 % de la actividad inhibitoria estudiada.

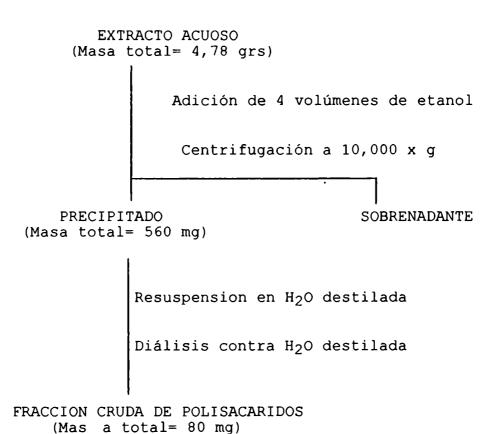
Una vez concluídas estas operaciones se determinó la actividad biológica de las distintas fracciones. Como puede observarse en el Cuadro 18, la fracción clorofórmica careció de actividad. Las actividades antifagocítica y antimitogénica se encontraron asociadas a la fracción metanólica y el principio activo anticomplementario a la fracción acuosa.

2.- Purificación del principio activo anticomplementario

El principio activo anticomplementario se encontraba asociado a una fracción acuosa, resultado de la extracción del material vegetal con agua caliente. Los datos obtenidos en la Sección III indicaban que el principo activo era termoestable y de elevado peso molecular, precipitando de una solución acuosa por agregado de alcoholes. Todo esto hacía presumir que el compuesto podría ser un polisacárido. Bajo dicho supuesto, la fracción acuosa fue sometida a los pasos de purificación que se presentan en el Esquema II con el fin de obtener una fracción cruda de polisacáridos.

Como se observa en el Cuadro 19, la actividad anticomplementaria se encontró asociada a la fracción cruda de polisacáridos, siendo la actividad específica del principio activo en esta reacción unas 5 veces mayor a la de la fracción acuosa.

Esquema 2: Obtención de una fracción cruda de polisacáridos (FCPS)



2.1.- Cromatografía de intercambio iónico en batch (DEAE-Sephadex A-25)

Con el fin de obtener una mayor separación de la fracción de polisacáridos se realizó una cromatografía de intercambio iónico en batch. Un volumen de la FCPS se aplicó a una resina intercambiadora aniónica (DEAE Sephadex A-25) equilibrada con buffer Tris-HCl, pH 6,5; 0,02 M. El material adherido se eluyó en primer lugar por fuerza iónica utilizando sucesivamente soluciones de ClNa de molaridad creciente (0,1; 0,5 y 1 M) y luego la elución se realizó por variación del pH con soluciones 0,5 N NaOH y 1 N NaOH manteniendo una concentración 1 M de NaCl. Se obtuvieron así seis fracciones a las cuales se dializaron contra agua destilada y se concentraron a presión reducida. A una alícuota de 1 ml de cada fracción se le determinó su actividad anticomplementaria y su peso seco (previa evaporación a sequedad a presión reducida) con el fin de determinar su concentración. Como se observa en el Cuadro 20 si bien todas las fracciones presentaron actividad anticomplementaria, la más activa resultó ser la fracción NA

Cuadro 19
ESTUDIO DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS DURANTE LA
PREPARACION DE LA FRACCION CRUDA DE POLISACARIDOS

Fracción	Conc.a (mg/ml)	Titulo ^b (DI ₅₀ /ml)	A.E. ^C (DI _{50%} /mg)	Prot.d (mg/ml)	Azúcares ^e (mg/ml)
Extracto acuoso	4,25	32	5,7	0,01	0,56
Sobrenad.		0			
Precip.	4,00	64	16,0	0,15	0,62
FCPS	5,00	128	25,6	0,13	0,64

 $^{^{\}rm a}$ Para determinar el peso seco 400 µl de cada fracción se evaporaron a presión reducida, determinándose el peso del material remanente.

La actividad anticomplementaria se estudió en la vía clásica según se detalla en el Cuadro 12.

b Las actividades se expresaron en dosis inhibitorias 50 % (DI_{50%}) = inversa de la dilución en la cual se observa el 50 % de la actividad inhibitoria estudiada.

C A.E.: La actividad específica se determinó realizando el cociente entre el título y la concentración en peso seco de cada fracción

d La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

e La concentración de azúcares se determinó por el método del fenol-sulfúrico.

presentando la actividad específica más alta. Por ello se eligió esta fracción para continuar la purificación. Es interesante destacar que esta fracción registró una muy baja concentración de proteínas (6,9 µg/m) de modo que la totalidad de la masa de la fracción (0,18 mg/ml) estaría compuesta por azúcares (0,20 mg/ml). No puede descartarse que las proteínas presentes estén asociadas a los polisacáridos constituyendo de esta manera peptidoglicanos.

2.2.- Cromatografía de filtración molecular en columna de Sepharosa 2B

Una alícuota de la fracción NA fue aplicada a una columna de filtración molecular Sepharosa 2B (rango de separación de dextranos: $10^5 - 20 \times 10^6$). La columna fue eluída con PBS. Se determinaron los perfiles de elución de azúcares y de la actividad anticomplementaria. Como puede observarse la Figura 18 registró un único pico de actividad se anticomplementaria que comigra con uno de los picos de azúcar.

Con el fin de estimar el PM de la fracción activa, dextranos patrones de PM de 2 x 10^6 , 5 x 10^5 y 1 x 10^5 D se corrieron en la columna en condiciones iguales a las que se corrió la fracción NA. Realizando un gráfico de PM vs Kav ,

Cuadro 20
ESTUDIO DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS
POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Fracción	Título ^a (DI _{50%})		A.E. ^C (DI _{50%} /mg)	Azúcares (mg/ml)	d _{Prot.} e (μg/ml)
No adsorbid (NA)	a 128	0,18	711,1	0,20	6,9
0,1 M NaCl	128	0,80	160,0	0,24	5,2
0,5 m NaCl	128	7,60	16,8	0,87	55,5
1 M NaCl	256	3,80	67,3	0,56	45,1
0,5 N NaOH 1,0 M NaCl	32	0,19	177,0	0,21	38,1
1 N NaOH 1 M NaCl	16	0,17	88,8	0,22	7,0

a El título se calculó como la inversa de la última dilución en la que se observó al menos un 50% de actividad inhibitoria.

C Actividad específica obtenida como el cociente del título y la concentración en peso seco de cada fracción.

b La concentración se determinó evaporando cada alícuota a presión reducida para obtener su peso seco y luego se dividió este valor por el volumen de dicha alícuota.

d La concentración de azúcares se determinó por el método de fenol-sulfúrico.

e La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

como se detalló en Materiales y Métodos, Sección 10.3.3.2., se estimó un PM de 3,16 x 10^5 D. para la fracción activa (Figura 19).

2.3. - Evaluación de la marcha de purificación del principio activo anticomplementario.

Los datos obtenidos a lo largo de las distintas etapas de purificación del principio activo anticomplementario se resumieron en el Cuadro 21.

Como puede observarse, se obtiene un alto índice de purificación luego de sólo 4 pasos de purificación. Si bien la recuperación para el último paso es bajo, está de acuerdo con datos de purificación de polisacáridos de similares características extraídos a partir de hojas (43, 94, 111, 139, 140, 143, 144).

Es interesante destacar que la estimación de peso seco del polisácarido coincide con la de azúcares totales. Este dato conjuntamente con la no detección de proteínas por los métodos de rutina hacen sospechar fuertemente que dicho polisacárido no estaría complejado con proteínas, si bien no podría descartarse que de existir una unión glicoprotéica esta podría haberse hidrolizado durante la obtención del azúcar. Cabe destacar que dicha molécula sería neutra y de elevado peso molecular. Estos datos son similares a los obtenidos por Van der Nat y col. (152), los cuales aislaron un polisacárido neutro de elevado

Cuadro 21 CUADRO DE PURIFICACION DEL PRINCIPIO ACTIVO ANTICOMPLEMENTARIO

Fracción	A.E. (DI _{50%} /mg) ^a	I.P.b	Recuperación (%)
Extracto Acuoso	5,7	1,00	100,00
Precipitado	16,0	2,80	11,71
FCPS	25,6	4,49	1,67
No Adsorbida	711,1	124,70	0,12
Pico Seph. 2-B	1080,00	189,47	0,06

peso molecular con actividad anticomplementaria de las hojas verdes de *Azadirachta indica*.

3.- Purificación de los principios activos antifagocítico y antimitogénico.

Según los datos obtenidos de la extracción del material vegetal seco en Soxhlet se determinó que tanto la actividad antifagocítica como la antimitogénica se encontraban presentes en la fracción metanólica. Por lo tanto, se decidió purificar dichas actividades a partir de esta fracción.

3.1.- Partición de la fracción metanólica en un sistema bifásico constituído por acetato de etilo y agua

una partición En primer lugar, realizó de los se componentes de la fracción entre acetato de etilo y agua. Para (2,57)fracción metanólica evaporada ello. la grs) se resuspendió en 250 ml de aqua destilada. Luego se realizó la partición con 1000 ml de acetato de etilo. Se obtuvieron así dos fracciones: acuosa y acetato de etilo, las cuales se evaporaron a sequedad antes de resuspender una alícuota de cada una de ellas en igual volumen de agua destilada para determinar sus actividad antifagocítica y antimitogénicas. Los resultados

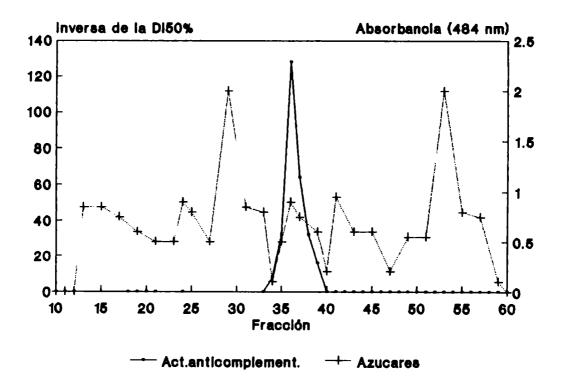


Figura 18: Filtración molecular de fracción NA en una columna de Sepharosa 2B

Un mililtro de la fracción NA se sembró en una columna de Sepharosa 2B de 160 ml de volumen total equilibrada con PBS. La eluyó con el mismo solvente y se recogieron columna se fracciones de 3 ml cada una. Se determinó la actividad anticomplementaria y la concentración de azúcares de las distintas fracciones.

La actividad anticomplementaria se estudió en la vía clásica según se detalla en la Figura 15.

Las actividades se expresaron en dosis inhibitorias 50 % (DI_{50%}) = inversa de la dilución en la cual se observa el 50 % de la actividad inhibitoria estudiada.

La presencia de azúcares se detectó por el método del fenol-sulfúrico (Materiales y métodos, Sección 9.1.3)

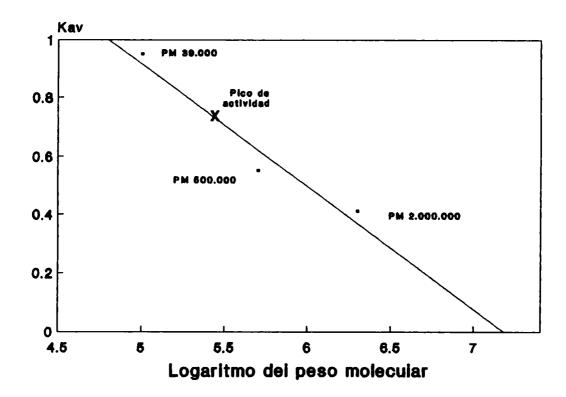


Figura 19: Determinación del PM de la fracción activa de polisácaridos eluída de la columna de Sepharosa 2B

Para la calibración de la columna se utilizaron dextranos de PM: 9.300, 39.000, 500.000 y 2.000.000. Estos se sembraron en una columna de Sepharosa 2B y se eluyeron en iguales condiciones que las descriptas en la Figura 18. Se recogieron fracciones de 3 ml cada una determinándose el perfil de elución de azúcares por el método del fenol-sulfúrico.

El peso molecular aproximado de la fracción activa se estimó de un gráfico del PM en función del Kav obtenido a partir de las sustancias marcadoras empleadas. El Kav se define como la relación: (Ve - Vo) / (Vt - Vo), donde Ve: volumen de elución de la sustancia, Vo: volumen de exclusión de la columna y Vt: volumen total de la columna.

El volumen total y el volumen muerto de la columna se determinaron utilizando azul Dextrán y cloruro de cobalto.

se exponen en el Cuadro 22. Como puede observarse, las actividades antifagocíticas y antimitogénicas totales resultaron similares para ambas fracciones, pero la actividad específica de la fracción acetato de etilo resultó ser mayor que la de la fracción acuosa. Por lo tanto, se utilizó dicha fracción para proseguir con la purificación.

El peso total de la fracción acetato de etilo evaporada a sequedad resultó ser de 210 miligramos.

Los pasos hasta aquí detallados se repitieron varias veces para obtener una mayor cantidad de material para las sucesivas etapas de la purificación.

3.2.- Cromatografía de adsorción en columna de Sílicagel 60 H

Quinientos miligramos de la fracción acetato de etilo se resuspendieron en metanol y se mezclaron con sílica para preparar un pastilla según se indicó en la sección 10.4.2 de Materiales y Métodos. Dicha pastilla se sembró en la parte superior de una columna de 120 gramos de sílicagel 60 H equilibrada con cloroformo a un volumen final de 200 ml. La columna se eluyó sucesivamente con 2 volúmenes de columna de cloroformo, 2 volúmenes de una mezcla cloroformo:metanol 95:5, 2 volúmenes de cloroformo:metanol 90:10 y un volumen de cloroformo:metanol 80:20. Las fracciones obtenidas se evaporaron y alícuotas de cada una de ellas se resuspendieron

Cuadro 22
ACTIVIDADES ANTIFAGOCITICA Y ANTIMITOGENICA PRESENTES EN LAS
FRACCIONES OBTENIDAS DE LA PARTICION DE LA FRACCION METANOLICA
EN UN SISTEMA ACETATO DE ETILO - AGUA

		Fracción	
	Acetato de	etilo	Acuosa
Actividad antifag.a DI50% A.E. (DI50%/mg)	1.000		1.000
Actividad antimitog. DI _{50%} A.E. (DI _{50%} /mg)	100.000 50.000		100.000
Concentración (mg/ml)	2,00		23,25
Proteinas (mg/ml)	N.D.		0,07
Azúcares (mg/ml)	0,50	·	15,21

aLa actividad se expresó en dosis inhibitorias 50% b La concentración se determinó evaporando cada alícuota a presión reducida para obtener su peso seco y luego se dividió este valor por el volumen de dicha alícuota.

A.E.= Actividad específica.

C La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

d La concentración de azúcares se determinó por el método de fenol-sulfúrico.

N.D.: No detectado

destilada determinar actividades en para sus antifagocítica y antimitogénica. Los resultados expuestos en el Cuadro 23 demuestran que dichas actividades se concentraron principalmente en la fracción eluída con la cloroformo:metanol 95:5. Por lo tanto, dicha fracción fue empleada en el siguiente paso de la purificación.

3.3.- Cromatografía en columna de Sephadex LH-20

La fracción activa de la columna de sílicagel (fracción 95: 5) se resuspendió en metanol y 1 ml de dicha fracción se sembró una columna de Sephadex LH-20 de 120 ml de volumen total equilibrada con metanol. La columna se eluyó con metanol, recogiéndose fracciones de 3 ml cada una. Dichas fracciones se evaporaron a presión reducida y alícuotas de las mismas se resuspendieron en agua destilada previamente a determinar sus actividad antifagocítica y antimitogénica. Los datos se presentan en la Figura 20 demuestran la presencia de dos picos con ambas actividades. El perfil de elución obtenido recuerda al obtenido con la corrida del extracto crudo en una columna de filtración molecular de Sephadex G-50 (Resultados, Sección III, 2.6).

Cuadro 23

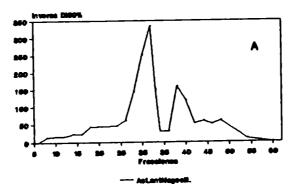
ACTIVIDADES ANTIFAGOCITICA Y ANTIMITOGENICA DE LAS FRACCIONES

OBTENIDAS DE LA COLUMNA DE SILICAGEL 60 H

Fracción Cl ₃ CH:CH ₃ OH	Peso a. (mg)	Actividad Antifag. ^C (DI _{50%} /ml)	Actividad Antimitog. ^C (DI _{50%} /ml)
100: 0 100: 0 95: 5 95: 5 90:10 90:10 80:20	58,30 46,75 56,70 80,00 20,10 11,25 15,00	10 10 51.200 26.500 160 10	100 100 1.000.000 100.000 100 100

a Se determinó el peso de las fracciones luego de ser evaporadas hasta sequedad a presión reducida.

b Todas las fracciones se resuspendieron en igual volumen de metanol (4 ml) y de allí se extrajeron alícuotas de igual volumen para determinar la actividad antifagocítica y antimitogénica. Dichas actividades se expresaron en dosis inhibitorias 50 % (DI $_{50}$ %) = inversa de la máxima dilución en la cual se observa al menos un 50 % de la actividad inhibitoria estudiada.



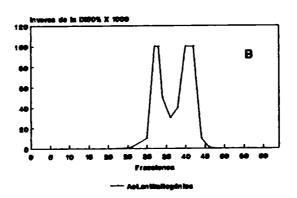


Figura 20: Perfil de elución de las actividades antifagocíticas y antimitogénicas de la columna de Sephadex LH-20

Un volumen de 1,0 ml de la fracción activa obtenida de la columna de sílica resuspendida en metanol se sembró en una columna de Sephadex LH-20 (Pharmacia) de 200 ml de volumen total equilibrada previamente con metanol. La columna se eluyó con metanol recogiéndose fracciones de 200 gotas cada una (aproximadamente 3 ml.). La actividad biológica de las fracciones se determinó según se explica en la Figura 15.

3.4.- Cromatografía en capa delgada

Los picos con actividad obtenidas de la elución de la columna de Sephadex LH-20 se resuspendieron en metanol y se utilizaron para sembrar una placa de aluminio con soporte de silicagel 60. Las muestras se sembraron con un punto utilizando para tal fin tubos capilares. En primer término se realizó una cromatografía capa delgada analítica. utilizando en cloroformo: metanol 95:5 como solvente de corrida. Una vez finalizada ésta se reveló la placa por inmersión en una mezcla de etanol:ácido sulfúrico 95:5, seguido de calentamiento a 100°C. Se observaron 6 bandas correspondientes al primer pico y 6 al segundo. La relación frontal (rf: cociente entre la distancia recorrida por una banda y la distancia recorrida por el solvente) de las mismas se detallan a continuación:

Pico 1: rf= 0,72; 0,59; 0,46; 0,20; 0,12 y 0,06.

Pico 2: rf= 0,94; 0,87; 0,68; 0,49; 0,22 y 0,06.

En vista a los resultados obtenidos se procedió a realizar una cromatografía en placa delgada preparativa. Para ello, el material a separar se sembró en una banda utilizando tubos capilares. La corrida se realizó en iguales condiciones que en el caso anterior. Los extremos de la placa se cortaron y revelaron. Luego se extrajo la sílica de aquellas regiones de la placa sin revelar que se correspondían con bandas observables en el material revelado. Los compuestos allí presentes se eluyeron de la sílica empleando metanol. Las

muestras se evaporaron y una alícuota de las mismas se resuspendió en agua destilada previamente a determinar sus actividades antifagocítica y antimitogénica. Como se observa en los Cuadros 24 y 25, sólo una banda en cada una de las corridas presentó actividad antifagocítica. En el caso de la corrida del pico 1 la banda de Rf= 0,12 poseía actividad antifagocítica mientras que para la corrida del pico 2 la banda activa fue la de Rf= 0,87.

Con respecto a la actividad antimitogénica se detectaron tres fracciones activas en el cromatograma del pico 1 (Rf=0,72; 0,59 y 0,12) y dos en el cromatograma del pico 2 (Rf=0,68 y 0,49). De las fracciones del pico 1 la fracción de mayor actividad resultó ser la de Rf=0,59, con una DI50% al menos 100 veces mayor que la de las otras fracciones activas. En el segundo cromatograma la fracción más activa fue la de Rf=0,68.

El peso seco de las fracciones fue en todos los casos menor a 0,05 mg, por lo que resultó imposible la determinación de actividades específicas.

Por último, es interesante destacar que no todas las fracciones con actividad antimitogénica poseían actividad antifagocítica. Sólo la fracción de Rf=0,12 del pico 1 presenta ambas actividades. Este paso de purificación permite separar ambas actividades las que habían copurificado a lo largo de todo el protocolo de purificación previo.

Cuadro 24

ACTIVIDADES ANTIFAGOCITICA Y ANTIMITOGENICA DE LAS FRACCIONES

OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA DEL PICO I DE LA

COLUMNA DE SEPHADEX LH - 20

		Pico 1	
Banda	a (RF)	Actividad ^a Antifagocítica (DI _{50%} /ml)	Actividad ^a Antimitogénica (DI _{50%} /m1)
1) 2) 3) 4) 5)	0,72 0,59 0,46 0,20 0,12 0,06	N.D. N.D. N.D. N.D. 800 N.D.	100.000 10.000.000 N.D. N.D. 100.000 N.D.

a Las actividades antifagocítica y antimitogénica se expresaron en dosis inhibitorias 50 % (DI $_{50\%}$) = inversa de la máxima dilución en la cual se observa al menos el 50 % de la actividad inhibitoria estudiada.

Todas las fracciones se resuspendieron en igual volumen de metanol (10 ml) y de allí se extrajeron alícuotas de igual volumen para determinar las actividades.

N.D.: No detectado.

Cuadro 25
ACTIVIDADES ANTIFAGOCITICA Y ANTIMITOGENICAS DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA DEL PICO II DE
LA COLUMNA DE SEPHADEX LH - 20

		Pico 2	
Banda	(RF)	Actividad a Antifagocítica (DI _{50%} /ml)	Actividad ^a Antimitogénica (DI _{50%} /ml)
1) 2) 3) 4) 5)	0,94 0,87 0,68 0,49 0,22 0,06	N.D. 400 N.D. N.D. N.D. N.D.	N.D. N.D. 10.000.000 1.000.000 N.D. N.D.

a Las actividades antifagocítica y antimitogénica se expresaron en dosis inhibitorias 50 % (DI $_{50}$ %) = inversa de la máxima dilución en la cual se observa al menos el 50 % de la actividad inhibitoria estudiada.

Todas las fracciones se resuspendieron en igual volumen de metanol (10 ml) y de allí se extrajeron alícuotas de igual volumen para determinar las actividades.

N.D.: No detectado.

DISCUSION

La familia de las Meliaceas constituye un grupo de plantas sido extensamente utilizado por distintos aborígenes para el tratamiento de un gran número enfermedades (26, 33, 46, 47, 85, 88, 107, 119, 126). investigaciones llevadas a cabo durante varios años en nuestro laboratorio con el fin de determinar la base científica de la utilización de estas plantas medicinales, han establecido que los extractos acuosos de hojas de distintas plantas de la familia Meliaceae poseen actividades inmunomoduladoras antivirales. Extractos acuosos de Melia azedarach L. y Cedrela tubiflora son capaces de inhibir "in vitro" la replicación de gran variedad de virus, tanto de genoma ADN como ARN (7, 9, 10, 35, 44, 157, 158) en ausencia de citotoxicidad (7, 8).

Por otro lado, se comprobó que los extractos acuosos de hojas verdes de *Melia azedarach L., Cedrela lilloi, Trichilia elegans* y *Cedrela tubiflora* presentan actividades inmunomoduladoras tanto "in vitro" como "in vivo" (22, 23, 24, 41, 42, 114).

En este contexto se consideró interesante la realización de estudios tendientes a evaluar la potencial actividad inmunomoduladora de los extractos de otra planta autóctona de la misma familia: Trichilia glabra (118).

Las investigaciones desarrolladas en el presente trabajo de tesis demuestran claramente que el extracto acuoso de hojas verdes de *Trichilia glabra* es capaz de modificar

significativamente distintos parámetros de la respuesta inmune del ratón Balb/c.

Los primeros datos obtenidos en tal sentido indicaron que el extracto poseía una significativa actividad anticomplementaria "in vitro" sobre el suero del ratón. Este efecto era dependiente de la dosis y más pronunciado en la vía clásica que en la alterna.

Datos similares han sido reportados para otras meliáceas. incubación de suero humano o de ratón con distintas concentraciones de los extractos acuosos de Melia azedarach L. o Cedrela tubiflora reducen de un modo dependiente de la dosis la capacidad hemolítica de dicho suero. Esta inhibición resultó ser independiente de la vía de activación del complemento ensayada (clásica o alterna) (23, 24). Cabe destacar que el efecto reportado para *Cedrela tubiflora* resultó ser importante que el observado en Melia azedarach L o Trichilia glabra. Recientemente se ha reportado la presencia actividades anticomplementarias "in vitro" en los extractos acuosos de hojas de las meliáceas autóctonas Cedrela lilloi y Trichilia elegans (114). Por otro lado, Labadie y col. (100) han demostrado que extractos acuosos de corteza de otras dos meliáceas, Azadirachta indica y Mumromia pumila, exhiben un fuerte efecto anticomplementario, inhibiendo la capacidad hemolítica del suero de ratón tanto sobre la vía clásica como sobre la alterna (100, 152). En vista que esta actividad se ha detectado en prácticamente todas las meliáceas estudiadas es

probable que el principio activo en cuestión sea común a todas ellas.

El efecto anticomplementario del extracto acuoso de Trichilia glabra se evidenció también "in vivo". Los sueros obtenidos de animales tratados con una única dosis (pero empleando distintas concentraciones) del extracto presentaron una marcada disminución en su capacidad hemolítica. Así como en el sistema "in vitro", el efecto fue más importante sobre la vía clásica que la alterna. Dicho efecto fue dosis dependiente y se mantuvo en los animales tratados por el término de 48 (vía alterna) o 72 h (vía clásica).

Es interesante destacar que el sistema del complemento, su rol benéfico en el control de distintas aparte de también interviene distintas enfermedades infecciones, en inflamatorias causando daños a los tejidos. El complemento es el principal responsable del fenómeno de inflamación aguda que se produce cuando un microorganismo, capaz de disparar la vía alterna, penetra en los tejidos. Los factores C3a y C5a actúan como anafilotoxinas e inducen la liberación por parte de los mastocitos vasoactivos l a de compuestos que inducen vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular con la consiguiente hinchazón y enrojecimiento. A su vez el componente C5a atrae a los PMN al sitio de la inflamación donde liberan compuestos tóxicos que coadyuvan al daño tisular. Este tipo de respuestas se encuentra exacerbada en algunas enfermedades inflamatorias como el reumatismo o la artritis reumatoidea. Por

lo tanto, el contar con un compuesto con actividad anticomplementaria podría ser de suma utilidad para el control de dichas afecciones.

Todos estos datos hacían interesante el aislamiento y caracterización del principio activo anticomplementario con vistas a su eventual utilización para el tratamiento algunas afecciones inflamatorias. Por lo tanto, en primer lugar se intentaron determinar las características bioquímicas del principio activo anticomplementario para lo cual el extracto de Trichilia glabra fue sometido, entre otros tratamientos, a diálisis, calentamiento y al pasaje por columnas de filtración molecular.

Se determinó así que la actividad anticomplementaria era no dializable (PM > 12,000 daltons) (Cuadro 10) y termoestable (no se detectó disminución de las actividad estudiada luego de calentar el extracto a ebullición durante distintos) (Figura 15). Tampoco se verificó disminución de dicha actividad luego del tratamiento del extracto crudo con dos proteolíticas: la tripsina de páncreas bovino y la proteinasa K (Cuadro 12). Estos datos por sí solos no permiten descartar una naturaleza proteica del principio anticomplementario ya que para ello sería necesario realizar ensayos con otras proteasas.

Tampoco se observó una disminución significativa de la actividad anticomplementaria luego de tratar el extracto con NaOH o HCl. En otra serie de experimentos, se determinó que al mezclar el extracto crudo con distintos alcoholes (isopropanol

se producía la precipitación de etanol) la anticomplementaria (Cuadro 14). Por último, se realizó corrida cromatográfica del extracto crudo en una columna de filtración molecular (Sephadex G-50, rango de separación: 1,500-30,000 D) determinándose que la actividad anticomplementaria era excluída totalmente de la columna eluyéndose en la fracción correspondiente al volumen muerto (Figura 16). Además, al determinarse la concentración proteínas y azúcares de las fracciones obtenidas la actividad anticomplementaria comigraba con un pico de azúcares.

Estos datos obtenidos al estudiar las características bioquímicas del principio activo anticomplementario concuerdan con la naturaleza guímica de los polisacáridos.

En base a los datos obtenidos resultaba interesante entonces intentar la purificación del principio activo anticomplementario presente en las hojas de Trichilia glabra. Para ello se partió de hojas secas y trituradas hasta la obtención de un polvo finamente particulado. Este material se extrajo con solventes de polaridad creciente (cloroformo, metanol determinándose la У agua) que actividad anticomplementaria se encontraba presente la en fracción acuosa. Dicha actividad se precipitó por agregado de etanol y se dializó para obtener una fracción cruda de polisacáridos. Esta fracción se cromatografió en una resina de intercambio aniónico determinándose que la actividad anticomplementaria se encontraba mayoritariamente en la fracción no adsorbida.

dicha fracción se Finalmente sembró en una columna de filtración molecular donde se obtuvo un solo pico con actividad, de unos 300,000 D de PM según se determinó por comparación con marcadores de PM. No se detectaron proteínas en esta fracción.

Por lo tanto, luego de esta marcha de aislamiento se obtuvo un polisacárido con un índice de purificación de 189 y una recuperación del 0,06% respecto al material de partida. Si bien este último valor es bajo, es similar al obtenido durante la purificación de polisacáridos con actividad anticomplementaria extraídos a partir de hojas de distintas plantas medicinales (43, 94, 111, 139, 140, 143, 144).

Por otro lado, la no detección de proteínas por los métodos de rutina conjuntamente con la resistencia al tratamiento con proteasas hacen sospechar fuertemente que dicho polisacárido no estaría complejado con proteínas, si bien no podría descartarse que de existir una unión glicoproteica ésta podría haberse hidrolizado durante la obtención del azúcar.

Estos datos son similares a los obtenidos por Van der Nat y col. (152), los cuales aislaron un polisacárido neutro de elevado peso molecular con actividad anticomplementaria de las hojas verdes de *Azadirachta indica*, planta de la familia de las meliaceas con reportada actividad antiinflamatoria.

Asímismo, numerosos reportes han asignando a polisacáridos la actividad anticomplementaria presente en extractos acuosos de distintas plantas medicinales empleadas en el tratamiento de

afecciones inflamatorias. Entre otros cabe destacar actividad anticomplementaria de polisacáridos ácidos extraídos de semillas de Plantago asiática , de Malva verticillata (148) y de Coix lacrima-jobi var Ma-yuen (186), de raiz de Bupleurum falcatum L. (188) y Glycyrrhiza uralensis (56, 83 y 134), de rizomas de Cnidium officinale y heteroglicanos ácidos de hojas de Artemisia princeps (182, 190). También se han aislado polisacáridos neutros con la misma actividad del estolón de Glycyrrhiza glabra (141), arabinogalactanos extraídos de raíces de Angelica acutiloba (92) y heteroglicanos de hojas de Panax gingseng (62). Es interesante mencionar que en todos estos los polisacáridos casos, tanto ácidos como los neutros presentan actividad anticomplementaria, no pudiéndose encontrar hasta el presente una relación entre la estructura de dichos compuestos y su actividad inmunológica (181).

En otra serie de experimentos se decidió estudiar el efecto del extracto de *T. glabra* sobre los PMN. Dichas células poseen en cultivo una vida media muy corta lo cual refleja una característica inherente a dichas células en el organismo. El neutrófilo posee receptores para C3b y Fc de IgG y es en general un fagocito altamente eficiente excepto cuando la partícula a fagocitar es grande en relación a la célula o cuando la cantidad de partículas a fagocitar es muy elevada. Los PMN llegan minutos después de producida la inflamación a la

zona donde se encuentra el agente infeccioso. Moléculas de adhesión específicas para PMN aparecen en la membrana de las células endoteliales después de un estímulo inflamatorio y mucho antes de que aparezcan moléculas de adhesión específicas para monocitos y linfocitos (129). El neutrófilo se adhiere la pared del endotelio y la atraviesa entonces а diapédesis. A partir de allí se mueve en contra de un gradiente de concentración de un agente quimiotáctico hasta alcanzar al microorganismo invasor. El PMN puede realizar tanto fagocitosis específica (mediada por receptores para Fc de IqG) inespecífica (mediada por receptores tales como las lectinas). Generalmente el estímulo fagocítico dispara mecanismos de muerte intracelular dependientes del oxígeno, denominados corrientemente estallido respiratorio debido al alto consumo de oxígeno por parte de las células, el cual es utilizado en la producción de compuestos microbicidas tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete y los hipocloritos. Por todas estas características los PMN resultan ser una primera línea de defensa en el organismo. Sin embargo, a pesar de todos estos efectos beneficiosos los PMN también intervienen en gran cantidad de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. Entre otras cabe citar: el enfisema, la la vasculitis la artritis reumatoidea, inmune, gota, la dermatosis neutrofílica y la psoriasis. Eldaño inducido por los PMN se debe a la producción y liberación de metabolitos tóxicos del oxígeno y a enzimas proteolíticas

presentes en sus gránulos las cuales son liberadas extracelularmente a los tejidos circundantes en lugar de hacia el interior de las vacuolas fagocíticas. Esto puede ocurrir durante un fenómeno denominado como fagocitosis frustrada, una condición en la cual el neutrófilo intenta fagocitar sustancias imposibles de ser ingeridas, como por ejemplo superficies dañadas de tejidos. Un ejemplo específico de enfermedad donde el PMN ejerce un rol central es la gota. En dicha enfermedad los PMN fagocitan cristales insolubles de ácido úrico depositados en las articulaciones. El PMN no puede digerir esta sustancia y se destruye liberando sustancias tóxicas generan daño tisular. Otra enfermedad donde intervienen los PMN es la artritis reumatoidea. En este caso enzimas lisosomales y otros mediadores de inflamación liberados por los neutrófilos luego de la ingestión de complejos inmunes depositados en las articulaciones serían responsables de parte del fenómeno inflamatorio característico de dicha enfermedad.

Por todo esto, y teniendo en cuenta la inhibición observada para el complemento, resultaba interesante determinar si el extracto era también capaz de inhibir la actividad fagocítica y el estallido respiratorio de los PMN. Debido a que el PMN ejerce su acción poco tiempo después de establecida una infección o una lesión (en el caso de ciertas enfermedades inflamatorias) se establecieron tiempos cortos de incubación con el extracto con el fin de determinar si el mismo era capaz de afectar de una manera rápida la actividad de estas células.

Es así que cultivos de PMN se incubaron por espacio de 15 min con distintas concentraciones del extracto y luego se realizaron los ensayos para evaluar las actividades estudiadas (Cuadro 6). Se observó que a altas concentraciones del extracto se producía una inhibición significativa de la fagocitosis de zymosán opsonizado y del metabolismo oxidativo en ausencia de toxicidad celular.

Resultados sido obtenidos dispares han con otras meliáceas. Los extractos acuosos de hojas de C.tubiflora ejercen un efecto antifagocítico sobre PMN murinos, aunque en este caso no se modifica el metabolismo oxidativo de dichas células (23). Por otro lado, el extracto acuoso de Melia azedarach L. no afectó la actividad fagocítica o el metabolismo oxidativo de los leucocitos polimorfonucleares (21, 22). Cabe destacar que Labadie y col. (100) han demostrado que extractos acuosos de corteza de Azadirachta indica inhiben la quimioluminiscencia inducida por zimosán de PMN humanos si bien su capacidad para ingerir bacterias radioactivas no se altera (100, 152).La purificación de los principios involucrados reveló que los mismos eran compuestos fenólicos de bajo PM: el ácido gálico, la (+)-catecina y la (-)-epicatecina, ninguno de estos compuestos afectaba la actividad fagocítica de dichas células. Asímismo, existen reportes que indican que extractos acuosos de hojas de Gingko biloba y de Aloe vera inhiben la producción de aniones superóxido por parte de neutrófilos humanos (110). En el caso de A.vera se ha

determinado que los responsables de la mencionada actividad son compuestos de PM < 10.000 (142). Un efecto inhibitorio sobre la producción de radicales libres del oxígeno también ha sido descripto para la curcumina (diferuloil metano), un compuesto activo antiinflamatorio aislado de rizomas de Curcuma longa Linn. (138). Por otro lado, se ha reportado que los extractos acuosos de hojas de Chrysanthemum parthenium inhiben capacidad fagocítica de polimorfonucleares humanos. Se considera que en este caso el efecto sobre los neutrófilos podría deberse al bloqueo de grupos sulfhidrilos en ciertas proteínas de dichas células (104).

Los efectos inhibitorios "in vitro" del extracto acuoso de Trichilia glabra sobre PMN y el sistema complemento se correlacionan con los resultados obtenidos "in vivo" sobre un modelo de inflamación inmediata inducido por zimosán. En dicho modelo la inyección en la almohadilla plantar de una suspensión de zimosán provoca en los animales una inflamación en el curso de las seis horas subsiguientes. La inflamación es causada por una acción conjunta del complemento y los PMN. El tratamiento los animales con el extracto produjo una de inhibición significativa (y dosis dependiente) de la respuesta de inflamación inmediata (Figura 12). Por lo tanto, se puede concluir que las actividades presentes en el extracto presentarían características promisorias para su eventual empleo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Es interesante destacar que los extractos acuosos de A.indica

también presentan actividad antiinflamatoria en un esquema de hipersensibilidad inmediata en ratones siendo el ácido gálico el compuesto responsable de dicho efecto (98).

En otra serie de estudios se determinó que la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratón resultaba inhibida luego de 24 h de cultivo en presencia de distintas concentraciones del extracto (Cuadro 1). La concentración de extracto que inhibió la fagocitosis al 50 % (CI50%) fue de 27,98 μg/ml. El extracto no sólo produjo un disminución en el número de células fagocíticas sino en el número de glóbulos rojos incorporados por cada célula (Figura 2). El alto índice de viabilidad luego del tratamiento (95%) conjuntamente con la reversión del estado antifagocítico generado en las células (Figura 3), permitió descartar que la actividad inhibitoria registrada fuera consecuencia de un efecto tóxico de los extractos sobre dichas células. Estudios complementarios permitieron determinar que eran necesarias al menos seis horas de incubación con el extracto para que se registrara dicho efecto (Figura 4), por lo cual se podría decir que el extracto induce en las células un "estado antifagocítico". Conviene aclarar que la capacidad fagocítica de las células se dosó mediante un ensayo de opsonoeritrofagocitosis. Es decir, se utilizó material particulado y opsonizado con IgG. Con el fin los estudios de la actividad profundizar acerca antifagocítica del extracto crudo, se realizaron ensayos de fagocitosis inespecífica utilizando partículas de sílica. Este

material ingresa a las células únicamente por fagocitosis resultando altamente tóxico para las mismas, ya que mueren al poco tiempo de haberlo ingerido. Era de esperar que si el extracto inhibía dicho proceso fagocítico, las células tratadas se verían protegidas de la muerte celular inducida por la sílica, ya que esta no podría penetrar en el interior de la células. Se determinó que esto no ocurre (Cuadro 2) ya que el porcentaje de células supervivientes luego de la incubación con partículas de sílica no difiere entre células tratadas con el extracto y controles. Estos resultados sugieren gue inhibición observada en los ensayos de opsonoeritrofagocitosis podría deberse a una "incapacidad" de los glóbulos rojos opsonizados para adherirse a las células. Con el fin de confirmar esta hipótesis se realizó un ensayo de rosetas. En este tipo de experimentos se enfrentan las células tratadas con glóbulos rojos opsonizados a 4°C de modo que las partículas opsonizadas puedan adherirse a los receptores de la membrana, resultados de ingresar. Los este experimento determinaron una inhibición en la formación de rosetas por parte del extracto. Es interesante destacar que en este caso la CI_{50} fue de 28,32 µg/ml, similar a la obtenida en el ensayo de inhibición de la opsonoeritrofagocitosis. Así, esta inhibición podría explicarse en principio por una ausencia de unión entre las células y las partículas opsonizadas. Este efecto podría deberse a una ausencia de receptores específicos en la membrana de las células tratadas o a una modificación de esos receptores

lo cual les impediría reconocer a su ligando. En ambos casos esto concuerda con el hecho de que el efecto antifagocítico no se manifiesta de forma inmediata, sino que es necesario cierto tiempo de incubación, por lo cual quedaría descartada posibilidad de un bloqueo directo del receptor. Quizás dicho tiempo sea el necesario para que se produzca el reciclaje de los receptores de la membrana, los cuales no serían reemplazados o bien serían reemplazados por otros defectuosos. Para detectar la presencia de receptores Fc gamma membrana de estas células podrían utilizarse anticuerpos marcados con un fluorocromo. También sería interesante realizar estudios de cinética de aparición/desaparición de receptores en la membrana.

Por otro lado, se pudo comprobar mediante un ensayo de de reduccion del NBT, que el extracto era capaz de afectar el estallido respiratorio de las células fagocíticas inhibiendo su capacidad de generar radicales libres. Dicha inhibición se manifestó tanto si se utilizaba como inductor un estímulo fagocítico (zimosán opsonizado) o uno no fagocítico (PMA) (Cuadros 4 y 5). Estos datos ponen en evidencia que el extracto acuoso de hojas verdes de *Trichilia glabra* no sólo es capaz de impedir la ingestión de antígenos particulados sino que ejerce un efecto directo sobre el metabolismo oxidativo de las células fagocíticas.

Asímismo, el extracto inhibió levemente el consumo de glucosa por parte de los macrófagos tratados (Figura 5). En

base a estos datos no es aventurado suponer que el extracto provoca una disminución en el metabolismo basal de las células tratadas.

Resultaba interesante pues observar como se comportaba un marcador biológico en los macrófagos tratados. Se utilizó para tal fin el virus Herpes simplex tipo I. Cultivos de macrófagos peritoneales murinos tratados con una concentración del extracto que inhibía totalmente la fagocitosis se infectaron con el virus. Más tarde se cosechó el virus producido y se lo tituló observándose que el tratamiento con el extracto no provocaba una reducción de la producción viral en las células (Figura 6) sino que, por el contrario, aumentaba la cantidad de virus producido. Efectos similares fueron reportados para el extracto acuoso de hojas verdes de Melia azedarach L.; administración intraperitoneal de dicho extracto disminuía la sobrevida de ratones infectados con el virus Herpes simplex. Se demostró que este efecto estaba asociado a un aumento de susceptibilidad de los macrófagos peritoneales extraídos de ratones tratados a la infección con el virus. Se comprobó también que el tratamiento con dicho extracto inhibía la producción de interferón-ß tanto "in vivo" como "in vitro" (11, 38). Esta inhibición de la producción de interferón-ß sería uno los mecanismos que puede explicar el aumento susceptibilidad de los macrófagos a la replicación viral, no pudiendo descartarse otras variables. Algo similar podría estar ocurriendo en este sistema con el extracto acuoso de T.glabra.

Por lo tanto, en base a los datos obtenidos, el extracto de T.glabra no pareciera afectar sustancialmente la funcionalidad de la maquinaria celular.

Por otro lado, es importante destacar que para que el virus infecte a las células es necesario que se asocie a receptores específicos en la membrana celular. Como la replicación viral no se vió disminuida podría suponerse que la presencia y funcionalidad de dichos receptores no se encontraba modificada. Esto indica que quizás no todos los receptores de membrana estarían afectados por el tratamiento con el extracto, como podría llegar a suponerse a partir de los datos obtenidos en los ensayos de inhibición de la formación de rosetas. Quizás aquellos receptores con "turn-over" más alto sean los más afectados por el tratamiento con el extracto. Sin embargo, por no disponer de la información respectiva no es posible por el momento confirmar dicha hipótesis. Sin embargo, para tratar de evaluar el efecto del extracto sobre otros tipos de receptores de membrana se incubaron macrófagos tratados durante 24 h con el extracto con un anticuerpo monoclonal que reconoce las isoformas de 200 kD de los antígenos CD45. Estos antígenos se expresan en todos los leucocitos y constituyen un grupo de alrededor de ocho glicoproteínas de membrana los cuales son productos de un único complejo génico presente en el cromosoma del ratón. Estos antígenos presentan intracitoplasmático con actividad de tirosina fosfatasa. tratamiento con los extractos no produjo modificación aparente en la expresión de estos antígenos por parte de los macrófagos ya que no hubo diferencias significativas en el número de células positivas para inmunofluorescencia en tratados y controles.

Por otro lado, macrófagos tratados del mismo modo que en el ensavo anterior se utilizaron para una reacción inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal OX6, que reconoce moléculas de histocompatibilidad de tipo II. En este caso, se observó una disminución significativa en expresión de dicho antígeno. Cabe destacar que estos antígenos fenómeno intervienen activamente en el de presentación antigénica por parte de los macrófagos. De modo que una disminución en la expresión de dichos antígenos podría traer aparejada una disminución de la respuesta inmune global. Estos resultados evidencian que el efecto del extracto se manifiesta selectivamente sobre algunas moléculas presentes en la membrana de las células.

Todos estos datos confirmarían un efecto supresor y en principio no generalizado, del extracto sobre la funcionalidad de los macrófagos. Si bien estas células son críticas para el control y eliminación de un gran número de patógenos, también pueden producir daño tisular asociado a la generación de metabolitos tóxicos oxigenados (15). Existen evidencias que indican que el anión superóxido puede modificar moléculas de

IgG provocando su agregación. Estos agregados actuarían como 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 artritis reumatoidea (106). Por lo tanto, el efecto inhibitorio observado tanto sobre la fagocitosis específica como sobre el estallido respiratorio (dependiente o independiente del estímulo fagocítico) es muy interesante en vistas a eventual utilización de los principios activos presentes en el extracto acuoso de T.glabra para el tratamiento de distintas afecciones inflamatorias.

Datos similares han sido obtenidos con extractos acuosos de otras meliáceas. En particular, se ha reportado que el tratamiento de macrófagos peritoneales murinos con los extracto acuosos de Melia azedarach L. y C.tubiflora inhibieron "in vitro" la fagocitosis y el estallido respiratorio de dichas células. Se demostró asimismo que, como ocurre en Trichilia glabra, esta inhibición del metabolismo oxidativo ocurre independientemente de que el estímulo utilizado involucre o no la activación de receptores de membrana (41, 42, 21). Extractos acuosos de las meliaceas Melia azedarach var. variegada, Melia toona, Melia toosedans, Cedrela lilloi y Trichilia elegans (114) también inducen una actividad antifagocítica en estas células.

Es importante mencionar los datos obtenidos en los ensayos de fagocitosis "in vivo" con el extracto acuoso de *Trichilia*

glabra. En los animales tratados con el extracto no se observó disminución en la capacidad fagocítica del sistema retículoendotelial (Figura 11), pero es importante destacar que el ensayo utilizado involucraba la remoción de carbón coloidal del torrente sanguíneo. Teniendo en cuenta que el carbón es una partícula que es fagocitada inespecíficamente y que el tratamiento con el extracto aparentemente no inhibe la fagocitosis inespecífica "in vitro", este resultado no sería sino la expresión "in vivo" de dicho fenómeno. Sin embargo, para evaluar en forma completa el efecto que ejerce el extracto "in vivo" sería necesario realizar por ejemplo, un ensayo de remoción del torrente sanguíneo de partículas opsonizadas, tales como complejos inmunes marcados con Cr^{51} . Dichos experimentos podrían dar una respuesta definitiva respecto al posible efecto antifagocítico "in vivo" ejercido por el extracto.

Por otro lado, resultó interesante determinar si el extracto acuoso era capaz de ejercer algún efecto sobre otras células del sistema inmune, en particular sobre los linfocitos. Para ello se realizaron cultivos de células esplénicas de ratón y se indujeron a proliferar con mitógenos en presencia de distintas concentraciones del extracto. Los mitógenos utilizados para estos ensayos "in vitro" fueron LPS y Con A los cuales inducen principalmente la proliferación de linfocitos B

y T respectivamente. En ambos casos el extracto produjo una marcada inhibición de la proliferación celular, sin afectar la viabilidad de las células (Cuadro 7 y Figura 7). El mismo efecto se observó cuando se utilizaron los ganglios linfaticos como fuente de células (Cuadro 8). Por lo tanto, en este contexto el o los principios activos presentes en el extracto de T. glabra parecen actúar indistintamente sobre células B o T. Es importante destacar que para estos ensayos de proliferación no se había realizado purificación alguna de la suspensión celular. Es decir que además de los linfocitos se encontraban presentes otros tipos celulares, en particular macrófagos, los cuales intervienen en dicho proceso proliferativo aportando citoquinas (66). Se planteó entonces la duda sobre si el efecto antiproliferativo observado se debía a un efecto directo sobre los linfocitos, o bien podía explicarse únicamente a la luz de efecto inhibitorio directo del extracto sobre metabolismo de los macrófagos. Se decidió entonces depletar en el mayor grado posible a la suspensión de células de bazo de las células adherentes que contuviera por medio incubaciones sucesivas en soporte de plástico. Esta suspensión semipurificada de células linfoides fue entonces inducida a proliferar en presencia de distintas concentraciones del extracto. Como en el caso anterior, se observó una importante inhibición de la proliferación celular. Por lo tanto, cabe presumir que este efecto antiproliferativo podría estar dado por un efecto directo del extracto sobre los linfocitos, si

bien no puede descartarse que en la suspensión de células de depletada totalmente de bazo, no adherentes, el efecto inhibitorio del extracto sobre el metabolismo de los macrófagos remantes también aportará al efecto antiproliferativo total observado. Hubiera sido interesante realizar una depleción más profunda de células adherentes para sacar una conclusión final sobre este tema. Por ejemplo, hubiera resultado de utilidad contar antimacrófago realizar con un suero para dicha eliminación celular efectiva. Experimentos complementarios determinaron que el efecto antimitogénico del extracto se correspondía con una disminución en la capacidad de las células linfoideas para producir una linfooquina: el Interferón gamma. Los cultivos de células tratados con el extracto producían niveles de interferón significativamente inferiores a sus pares no tratados (Cuadro 9).

Es interesante destacar que el tratamiento "in vitro" de linfocitos de bazo o ganglio de ratón con distintas concentraciones de los extractos acuosos de Melia azedarach L., Cedrela tubiflora, Cedrela lilloi y Trichilia elegans produjo un marcado descenso en la proliferación inducida por mitógenos en dichas células (114, 21, 41)

Los datos obtenidos "in vitro" con el extracto acuoso de Trichilia glabra hicieron interesante determinar si dicho extracto ejerce "in vivo" algún efecto sobre ciertas respuestas inmunitarias donde intervienen activamente los linfocitos, como son la producción de anticuerpos, la reacción de injerto contra huésped y el fenómeno de hipersensibilidad retardada. Cabe destacar que en este tipo de respuestas también intervienen otros tipos celulares, en partícular los macrófagos los cuales actúan principalmente como células presentadoras y ejercen algún rol efector en el fenómeno inflamatorio generado, en particular durante la respuesta de hipersensibilidad retardada (128).

Lo primero que se estudió fue el efecto que ejercía el extracto sobre la respuesta de producción de anticuerpos en el ratón frente a la inoculación i.p. de eritrocitos de carnero. Se emplearon distintas vías y esquemas de administración del extracto, pero únicamente cuando el extracto fue administrado por vía intragástrica durante los dos días anteriores a la inducción fue posible observar algún efecto inhibitorio en la respuesta de anticuerpos. Estas diferencias podrían estar indicando que quizás se requiere algún tipo de degradación o metabolización particular de algún/os componentes del extracto para ejercer el efecto detectado.

En el caso de *Melia azedarach* L. la administración del extracto por vía intraperitoneal fue capaz de inhibir significativamente la producción de anticuerpos y el número de células formadoras de placas de lisis, por lo cual no se ensayaron otras vías de administración del extracto (41).

A continuación, se evaluó el efecto del extracto de Trichilia glabra sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada (HSR) de ratones inmunizados con bajas dosis de

glóbulos rojos de carnero (GRC). La respuesta de HRS no se manifiesta cuando el huésped toma contacto con el antígeno por primera vez pero sí aparece en cualquier contacto subsiquiente elmismo. En con esta reacción están involucrados principalmente dos tipos celulares: macrófagos y linfocitos T de hipersensibilidad retardada. Cuando estos linfocitos son sensibilizados por un antígeno determinado son capaces, al entrar en contacto por segunda vez con dicho antígeno, liberar linfoquinas que atraen y activan a los macrófagos, desencadenándose así una reacción de tipo inflamatorio.

estudiar el los extractos sobre Para efecto de la respuesta de HSR a GRC, se utilizó un modelo en ratón el cual consta de dos fases: una de inducción de la respuesta y otra fase de desencadenamiento de la respuesta. El estudio del efecto del extracto sobre este sistema consistió en realizar dos tratamientos distintos. Un grupo de animales fue tratado sólo durante los días previos a la inducción de la respuesta mientras que otro grupo de animales fue tratado sólo durante la fase de desencadenamiento de la respuesta. En ambos casos se obtuvo una disminución significativa y dosis dependiente de la respuesta estudiada (Figura 13), si bien el efecto resultó ser más marcado cuando el extracto se aplicó durante la segunda fase de la respuesta. Es necesario destacar que mediante estos ensayos no se prueba únicamente el efecto del extracto sobre la actividad de la células T debido a que los macrófagos se encuentran involucrados en los distintos procesos relacionados con estas pruebas, ya sea como células presentadoras durante la etapa de sensibilización de las células T (fase de inducción de la respuesta de HSR) o como células efectoras durante la fase de desencadenamiento de dicha respuesta.

Cabe destacar que los extractos acuosos de *Melia azedarach*L., *Cedrela lilloi* y *Trichilia elegans* ejercen "in vivo" un efecto supresor de la respuesta de hipersensibilidad retardada en el ratón albino similar al ejercido por *T.glabra* (41, 114).

Con el fin de completar los ensayos "in vivo", se decidió estudiar el efecto del extracto sobre un sistema de injerto contra huésped. 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 Т mayores dirigidas hacia antígenos de histocompatibidad no propios. Entre los distintos modelos experimentales que permiten evaluar este aspecto de respuesta inmune se halla la reacción local de injerto contra huésped decripta por Ford y Simonsen, utilizada en este trabajo (58). Los resultados obtenidos indicaron que al inocular células de bazo de una de las cepas parentales (Balb/c) a ratones híbridos F1 (Balb/c x AKR/J) no se observó modificación alguna de la respuesta de injerto contra huésped en animales tratados con extracto respecto a los controles sin tratar. Es interesante destacar que en este caso los animales

recibieron una única dosis del extracto y por vía endovenosa. No se puede descartar que, como en el caso de la respuesta de anticuerpos, el empleo de otras vías y/o esquemas de administración del extracto pueda producir efectos inhibitorios en este tipo de respuesta. Por el contrario, utilizando el mismo esquema de tratamiento que para T.glabra, el extracto acuoso de Melia azedarach L. ejerce "in vivo" un efecto supresor de la reacción injerto contra huésped (41).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en los experimentos tanto en "in vitro" como "in vivo" resultan muy promisorios puesto que determinan que el extracto acuoso de hojas de Trichilia glabra contiene principios activos capaces modificar distintos aspectos de la respuesta inmune del ratón, sin provocar toxicidad aparente. Resultó interesante entonces caracterizar los principios activos antifagocíticos antimitogénicos con vistas a una eventual utilización de los el tratamiento de distintas mismos para inflamatorias. Con vistas a determinar las características bioquímicas de dichos principio/s activo/s presentes en el extracto de Trichilia glabra se hicieron en primer lugar los mismos estudios sobre el extracto crudo que los realizados la caracterización durante del principio activo anticomplementario. Se determinó que las actividades así antifagocítica y antimitogénica se perdían durante diálisis. Para determinar si la actividad antifagocítica o la antimitogénica estaban asociadas a compuestos de bajo PM o si

la ausencia de actividad se debía a la pérdida de pequeños cofactores se procedió a realizar una diálisis reversa. Se verificó entonces que ambas actividades se encontraron presentes en el interior de la bolsita y a valores comparables a los presentes en el extracto crudo. Por lo tanto, se pudo asignar dichas actividades a principios de bajo peso molecular (PM < 12,000 daltons) (Cuadro 10).

Por otro lado, ambos principios activos resultaron ser termoestables ya que no fue posible detectar una disminución apreciable en ninguna de las actividades estudiadas luego de calentar a ebullición el extracto durante distintos tiempos. Asimismo, tampoco se verificó disminución de dichas actividades luego del tratamiento del extracto crudo con una proteolítica, la tripsina de páncreas bovino, pero observó una marcada disminución de la actividad antifagocítica al tratar al extracto con proteinasa K (Cuadro 12). Es interesante destacar que esta sensibilidad de la actividad antifagocítica frente a la proteasa estaría indicando una identidad proteíca del principio activo. No es posible descartar que el principio antimitogénico también fuera de naturaleza proteíca, para ello sería necesario realizar ensayos con otras proteasas.

Por otro lado, las actividades antifagocítica y antimitogénica fueron abolidas totalmente al tratar el extracto con NaOH o HCl llevando el pH del mismo a 10 o 3 respectivamente. Al realizar una corrida cromatográfica del

extracto crudo en una columna de filtración molecular (Sephadex G-50) se determinó que las actividades antifagocítica y antimitogénica comigraban en dos picos que se correspondían a fracciones de 10,500 y 2,500 D de PM según se determinó por comparación con patrones de PM (Figura 16). Es interesante destacar que dichas actividades no comigraban con pico alguno de proteínas o azúcares.

los datos obtenidos resultaba interesante base a entonces intentar la purificación de los principios activos presentes en las hojas de Trichilia glabra. Para ello las hojas de Trichilia glabra se desecaron y luego trituraron hasta la obtención de un polvo finamente particulado. Este material se extrajo en caliente sucesivamente con solventes de polaridad creciente, cloroformo, metanol y agua, determinándose que la actividades antifagocítica y antimitogénica eran extraídas con metanol. El extracto así obtenido se evaporó a sequedad y luego se resuspendió en aqua para realizar una partición con acetato de etilo. Se comprobó que las actividades quedaban distribuida en ambas fracciones, siendo la actividad específica de la fracción acetato de etilo varias veces superior a la presente en la fracción metanólica. Por lo cual se decidió continuar la purificación a partir de la primera de dichas fracciones. Esta fue evaporada a sequedad y luego se sembró en un columna de sílicagel y se eluyó con distintas mezclas de cloroformo y metanol. La fracción activa resultó ser la cloroformo: metanol, la cual se cromatografió en una columna de LH-20 95:5

obteniéndose dos picos con ambas actividades. Dichos picos fueron cromatografiados en placa delgada revelándose 7 bandas en cada una de las corridas. Las actividad antifagocítica se encontró asociada a las bandas de rf: 0,12 para el cromatograma del pico 1 y rf: 0,87 para el cromatograma del pico 2. La banda de rf: 0,12 también presentó actividad antimitogénica. El resto de las bandas con actividad antimitogénica (rf: 0,59 para el cromatograma del pico 1 y rfs: 0,68 y 0,49 para el cromatograma del pico 2) no presentaron actividad antifagocítica, por lo tanto en este paso de purificación fue posible separar ambas actividades. En vista a todos estos datos se puede concluir que las actividades estudiadas son ejercidas distintos por compuestos de bajo peso molecular, y de naturaleza peptídica actividad para el caso del compuesto responsable de la antifagocítica. Dado que ambos principios activos presentaron características químicas similares, no sería arriesgado suponer una naturaleza química similar para los mismos.

Es interesante destacar que, más alla de lo reportado en nuestro laboratorio para Cedrela tubiflora, Cedrela lilloi, Melia azedarach L. y Trichilia elegans, la bibliografía es prácticamente nula en lo que respecta a compuestos de origen vegetal con actividad antimitogénica y/o antifagocítica. Por el contrario, se ha reportado la existencia de extractos vegetales o compuestos de origen vegetal con actividades estimuladoras de la mitosis de células linfoides o de la fagocitosis de macrófagos. En particular, polisacáridos ácidos obtenidos a

partir de la hierba medicinal japonesa "Juzan-tahio-to" y polisacáridos neutros extraídos de pimpollos de sabdariffa estimulan significativamente la proliferación de cultivos de células esplénicas de ratones BALB/c (189, 98). Una estimulación "in vitro" de la fagocitosis de macrófagos sido reportada para rhamnoarabinogalactanos y arabinogalactanos extraídos de las flores de Calendula officinalis, arabinogalactanos aislados de cultivos celulares de Echinacea purpurea (105, 156). Por último, cabe destacar que administración por via i.p. de polisacáridos extraídos del rizoma de Curcuma longa, de la raiz de Glycyrrhiza uralensis o del rizoma de Cnidium officinale provocan un aumento de la tasa de eliminación de carbón del torrente sanguíneo en un ensayo de fagocitosis "in vivo" en ratones (182,149).

Como conclusión respecto del efecto del extracto sobre distintos parámetros de la respuesta inmune del ratón, se puede decir que el extracto de *Trichilia glabra* ejerce una poderosa actividad inhibitoria "in vitro" sobre macrófagos, PMN, linfocitos y el sistema complemento.

Por otro lado, los datos obtenidos en este trabajo de tesis indican que el extracto acuoso de hojas verdes de **Trichilia glabra** pareciera ejercer, "in vivo", un efecto inhibitorio preferencial sobre fenómenos inflamatorios, como son la respuestas de inflamación inmediata y de hipersensibilidad retardada.

La escasa disponibilidad de compuestos que ejerzan las actividades aquí estudiadas hacen atractiva la continuación de estas investigaciones, las que quizás en un futuro no muy lejano puedan aportar nuevos productos terapeúticos que tiendan a mejorar la calidad de vida de los seres humanos.

FAISIAN BENENCIA

F Conting of

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.- A. Agostoni, M. Cicardi, M. Gardinali y L. Bergamaschini (1992). The complement system. International Journal of Immunopathology and Pharmacology 5 (2), 123 -.
- 3.- A.C. Allison, B.M.J.S. Harington y M. Birbec (1966). An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. The Journal of Experimental Medicine 124, 141 -.
- 4.- H.P.T. Ammon, T. Mack, G.B. Singh y H. Safayhi (1991). Inhibition of leucotriene formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of **Boswelia serrata**. Planta Medica 57, 203 -.
- 5.- H.P.T. Ammon, H. Safayhi, T. Mack y J. Sabieraj (1993). Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. Journal of Ethnopharmacology 38, 113 -.
- 6.- D.M.W. Anderson y A. Hendrie (1971). The proteinaceous gum polysaccharide from *Azadirachta indica* A Juss.. Carbohydrate Research 20, 259 -.

- 7.- G.M. 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 -.
- 8.- 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 -.
- 9.- G.M. 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.
- 10.- 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 -.
- 11.- G.M. Andrei, F.C. Coulombié, M.C. Courrèges, R.A. de Torres y C.E. Coto (1990). Meliacine, am antiviral compound from *Melia azedarach* L. inhibits interferon production. Journal of Interferon Research 10, 196 -.

- 12.- 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 -.
- 13.- R. Anton, Y. Jiang, B. Weniger, J.P. Beck y L. Rivier (1993). Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret.. Journal of Ethnopharmacology 38, 153 -.
- 14.- K.T. Atherton y D.C. Burke (1978). The effects of some different inhibitors on interferon superinduction. Journal of General Virology 41, 229 -.
- 15.- J.A. Badwey y M.L. Karnovsky (1980). Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Annual Review of Biochemistry 49, 695 -.
- 16.- 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 -.
- 17.- L. Barbieri y F. Stirpe (1982). Ribosome-inactivating proteins from plants: properties and possible uses. Cancer Surveys 1, 489 -.

- 18.- H. Bartfeld (1977). Immunological studies demonstrating enhancing effect of aristolochic acid on immunoreactions. Arzneimittel-Forschung/Drug Researh 27, 2297 -.
- 19.- R. Bauer, K. Redl y B. Dans (1992). Four polyacetylene glucosides from *Bidens campylotheca*. Phytochemistry 31, 2035 -.
- 20.- 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 -.
- 21.- 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.
- 22.- 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 -.
- 23.- F. Benencia, M.C. Courrèges y F.C. Coulombié (1996). "in vitro" activities of *Cedrela tubiflora* leaf extracts over

murine macrophages, polymorphonuclear leukocytes and complement. Phytotherapy Research (en prensa).

- 24.- F. Benencia, M.C. Courrèges, M.M. Nores y F.C. Coulombié (1996). Immunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. Journal of Ethnopharmacology (en prensa).
- 25.- 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 -.
- 26.- D.S. Bhakuni, M.L. Dhar, M.M. Dhar, B.W. Dhawan, B. Gupta y R.C. Skimal (1971). Screening of Indian Plants for biological activity. Part III. Indian Journal of Experimental Biology 9, 91 -.
- 27.- 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 -.
- 28.- L.H. Block, A. Georgopoulos, P. Mayer y J. Drews (1978). Nonspecific resistance to bacterial infection. Enhacement by Ubiquinone-8. The Journal of Experimental Medicine 148, 1228 -.

- 29.- L. Bohlin (1993). Research on pharmacologically active natural products at the Department of Pharmacognosy, Uppsala University. Journal of Ethnopharmacology 38, 225 -.
- 30.- E.C. Borden, F.A. Murphy y N. Nathanson (1974). Tacaribe virus infection of the mouse: an immunopathologic disease model. Laboratory Investigations 30, 465 -.
- 31.- 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 -.
- 32.- M.A. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantification od protein utilizing a principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248 -.
- 33.- H. Burkill (1966). A dictionary of economic products of the Malay peninsula, Tomo V, página 1465.
- 34.- 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 -.

- 35.- H. Cavalieri (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.
- 36.- A.K.N. Chaudhuri, S. Pal, A. Gomes y S. Bhattacharya (1990). Antiinflammatory and related actions of *Sygium cuminii* seed extract. Phytoherapy Research 4(1), 5 -.
- 37.- R.N. Chopra, S.L. Nayar, J.C. Chopra (1956). Glossary of indian medicinal plants. CSIR Publications, New Delhi, India, página 43.
- 38.- 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 leave 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.
- 39.- P. Conti, M.R. Pinara, S. Fridas, R.C. Barbacane, A. Grill, F.C. Placido, M. Reale y S. Fiore (1993). Inhibition of granuloma formation induced by potassium permanganate in the mouse by the specific human recombinant receptor antagonist for interleukin-1 (hrIL-1ra). Cellular Immunology 147, 446 -.

- 40.- 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 -.
- 41.- M.C. Courrèges (1994). Efectos inmunomoduladores de extractos acuosos de hojas de *Melia azedarach* L. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- 42.- M.C. Courrèges, F. Benencia, C.E. Coto, E.J. Massouh y F.C. Coulombié (1994). "in vitro" antiphagocytic effect of *Melia azedarach* leaf extracts on mouse peritoneal exudate cells. Journal of Ethnopharmacology 43, 135 -.
- 43.- J.K. Czop y K.F. Austen (1985). Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte ß-glucan receptor. Journal of Immunology 135, 3388 -.
- 44.- 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 -.

- 45.- P.A.G.M. De Smet (1993). An introduction to herbal pharmacoepidemiology. Journal of Ethnopharmacology 38, 197 -.
- 46.- L. Dhar, M.M. Dhar, B.N. Dhawan, B.N. Mehratra y C. Ray (1968). Screening of Indian Plants for biological activity. Part I. Indian Journal of Experimental Biology 6, 232 -.
- 47.- L. Dhar, M.M. Dhar, B.N. Dhawan, B.N. Mehratra y C. Ray (1968). Screening of Indian Plants for biological activity. Part II. Indian Journal of Experimental Biology 7, 250 -.
- 48.- I. Domke, P. Straur, H. Jacobsen, H. Kirchner y A. Panet (1985). Inhibition of replication of Herpes Simplex Virus in mouse macrophages by interferons. Journal General Virology 66, 2231 -.
- 49.- 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, Kluver Academic Publishers, Boston, USA, página 171.
- 50.- M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28, 350 -.

- 51.- M. Duwiejua, I.J. Zeitlin, P.G. Waterman, J. Chapman, G.J. Mhango y G.J. Provan (1993). Antiinflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. Planta Medica 59, 12 -.
- 52.- N.L. Etkin y P.J. Ross (1991). Should we set a place for diet in ethnopharmacology?. Journal of Ethnopharmacology 32, 25 -.
- 53.- N.L. Etkin (1993). Antropological methods in ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology 38, 93 -.
- 54.- 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 -.
- 55.- N.R. Farnsworth (1993). Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. Journal of Ethnopharmacology 38, 145 -.
- 56.- R.S.H. Finney y G.F. Somers (1958). The antiinflammatory activity of glycyrrhetinic acid and derivatives. Journal of Pharmaceutical Pharmacology 10, 613 -.

- 57.- R.J. Flower y J.R. Vane (1974). En: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, H.J. Robinson and J.R. Vane (eds), Raven Press, New York, USA, página 9.
- 58.- W.L. Ford, W. Burr y M. Simonsen (1970). A lymph node weight assay for the graft-versus-host activity of rat lymphoid cells. Transplantation 10, 258 -.
- 59.- G. Franz (1989). Polysaccharides in Pharmacy: current applications and future concepts. Planta Medica 55, 493.
- 60.- T. Fujiwara, T. Takeda, Y. Ogihara, 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 -.
- 61.- T. Fujiwara, E. Sugishita, T. Takeda, Y. Ogihara, M. Shimizu, T. Nomura y Y. Tomito (1984). Further studies on the structure of polisaccharides from the bark of *Melia* azadirachta. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 32, 1385 -.
- 62.- Q. Gao, H. Kiyohara, J. Cyong y H. Yamada (1989). Chemical properties and anticomplementary activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng*. Planta Medica 55, 9 -.

- 63.- Q. Gao, H. Kiyohara, J. Cyong y H. Yamada (1991). Chemical properties and anti-complementary activities of heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng*. Planta Medica 57, 132 -.
- 64.- S. Gillis, M.M. Ferm, W. Ou, y K. Smith (1978). T-Cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. Journal of Immunology 120, 2027 -.
- 65.- 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 -.
- 66.- P. Golstein 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 -.
- 67.- E.S. Golub y D.R. Green (1991). Immunology: a synthesis. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, U.S.A.
- 68.- R. Gonda, M. Tomoda, N. Shimizu, M. Kanari y H. Yamada (1990). Constituents of the seed of *Malva verticillata*. VI. Characterization and immunological activities of a novel acidic polysaccharide. Chem. Pharm. Bull. 40(4), 990 -.

- 69.- R. Gonda, M. Tomoda, K. Takada, N. Ohara y N. Shimizu (1992). The core structure of Ukonan A, a phagocytosis activating polysaccharide from the rhizome of *Curcuma longa*, and immunological activities of degradation products. Chem. Pharm. Bull. 40(4), 990 -.
- 70.- C. Gopalakrishman, 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 -.
- 71.- D.R. Green, P.M. Flood y R.K. Gershon (1983). Immunoregulatory T-cell pathways. Annual Review of Immunology 1, 439 -.
- 72.- 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 -.
- 73.- E. Gros, A.B. Pomilio, A.M. Seldes y G. Burton (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Monografía Nº 30. Serie de Química. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.

- 74.- J.W. Hadden (1989). Therapeutic immunopharmacology. Current Opinion in Immunology 2, 258 -.
- 75.- 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 -.
- 76.- 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 -.
- 77.- I. Hedberg (1987). Research on medicinal and poisonous plants of the tropics. Past, present and future. Medicinal and poisonous plants of the tropics. Editado por Pudoc Wageningen, Netherlands.
- 78.- I. Hedberg (1993). Conservation of medicinal plants in the tropics. A global responsability. Acta Horticulturae 330, 59 -.
- 79.- I. Hedberg (1993). Botanical methods in ethnopharmacology and the need for conservation of medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 38, 121 -.

- 80.- M.S. Hirsch, B. Zisman y A.C. Allison (1970). Macrophages and age-dependent resistance to Herpes Simplex Virus in mice. Journal of Immunology 104, 1160 -.
- 81.- L. Hudson y P. Hay (1980). Practical Immunology. Alexander Thomas Blackwell Scientific Publications Ed., Edinburgo, Inglaterra.
- 82.- K. Imamashi (1993). Aloctin A, an active substance of *Aloe* arborescens Miller as an immunomodulator. Phytotherapy Research 7, 20 -.
- 83.- H. Inouve, T. Mori, S. Shibata y Y. Koshihara (1989). Modulation by glycyrrhetinic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. Britain Journal of Pharmacology 96, 204 -.
- 84.- A. Kabbas, A. H. Lichtman y J.S. Parker (1991). Molecular basis of T cell antigen recognition and activation. Cellular and Molecular Immunology, M.J. Wonsiewickz, W.B. Saunders Company, Harcount Brace Janovich Inc., pág. 139 -.
- 85.- L.D. Kapoor (1993). Ayurvedic Medicine of India. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 1 (4), 37 -.
- 86.- M.L. Karnovsky y J.K. Lazdins (1978). Biochemical criteria for activated macrophages. Journal of Immunology 121 (3), 809-.

- 87.- 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.
- 88.- S.A. Khalid, H. Duddeck y M. González Sierra (1989). Isolation and characterization of an antimalarial agent of the Neem tree *Azadirachta indica*. Journal of natural products 52 (5), 922 -.
- 89.- J.Y. Kim, D.R. Germolec y M. I. Luster (1990). *Panax* ginseng as a potential immunomodulator: studies on mice. Immumopharmacology and Immunotoxicology 12(2), 257 -.
- 90.- F. Kiuchi, M. Shibuda y U. Sankawa (1982). Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Alpinia officinarum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30, 2279 -.
- 91.- F. Kiuchi, M. Shibuda y U. Sankawa (1982). Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from ginger. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30, 754 -.
- 92.- H. Kiyohara, H. Yamada, J. Cyong y Y. Otsuka (1986). Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba* V. Molecular aggregation and anticomplementary activity of arabinogalactan

from **Angelica acutiloba**. Journal Pharmacobiology and Pharmacodynamics. 9, 339 -.

93.- J.P.A.M. Klerx, C.J. Beukelman, H. Van Dijk y J.M.N. Willers (1983). Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. Journal of Immunological Methods 63, 215 -.

94.- J.P.A.M. Klerx, H. Van Dijk, W.J. Van der Madden y J.M.N. Willers (1985). Analytic Study of the differential anticompleemntary effects of dextran sulphate and heparine in the assay for the mouse alternative pathway. International Archives of Allergy and Applied immunology 78, 182 -.

- 95.- U. Knaus (1989). Komplementaktive Verbindungen aus der grunlippigen Muschel **Perna canaliculus** (Gmelin). Tesis de Doctorado, Universidad de Munich.
- 96.- Y. Kojima, S. Konno, S. Tamamura y T. Hashimoto (1980). Substance with interferon inducing activity. Chemical Abstrats 94, 52919 s.
- 97.- 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.

- 98.- S. Kosasi, L.A. 't Hart, H. van Dijk y R.P. Labadie (1989). Inhibitory activity of *Jatropha multifida* latex on classical complement pathway activity in human serum mediated by a calcium binding proanthocyanidin. Journal of Ethnopharmacology 27, 81 -.
- 98.- B.H. Kroes, A.J.J. Van den Berg, H.C. Quarles van Ufford, H. van Dijk y R.P. Labadie (1991). Antiinflammatory activity of gallic acid. Planta Medica 58, 485 -.
- 99.- B.H. Kroes, A.J.J. Van den Berg, R.P. Labadie, A.M. Abeysekera y K.T.D. de Silva (1993). Impact of the preparation process on immunomodulatory activities of the ayurvedic drug Nimba arishta. Phytoterapy Research 7, 35 -.
- 100.- R.P. Labadie (1986). Problems and possibilities in the use of traditional drugs. Journal of Ethnopharmacology 15, 221 -.
- 101.- 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. Bamanuarachi y K.T.D. de Silva (1989). An ethnopharmacognostic approach to the search for immunomodulators of plant origin. Planta Medica 55, 339 -.

- 102.- F.J. Lipp (1989). Methods for ethnopharmacology field work. Journal of Ethnopharmacology 25, 139 -.
- 103.- H. Lis y N. Sharon (1973). The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). Annual Review of Biochemistry 42, 541 -.
- 104.- 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 extrat of *Chrysanthemum parthenium*. Planta Medica 54, 381 -.
- 105.- 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 -.
- 106.- 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 -.
- 107.- R. Martínez Crovetto (1981). Plantas utilizadas en medicina en el Noroeste de Corrientes. Fundación Miguel Lillo Miscelanea 69, Tucumán, Argentina.

- 108.- M.M. Mayer (1961). Complement and complement fixation. Experimental Immunochemistry, I.A. Kabat y M.M. Mayer (Editors). Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, págs. 133 a 240.
- 109.- 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 alkylysophospholipids. Cancer Research 39 (110), 4681 -.
- 110.- J.C. Monboisse, R. Garnotel, M.T. Droy-Lefaix y J.P. Borel (1993). A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) inhibits superoxide anion production by neutrophils. Advances in *Ginkgo biloba* extracts Research 2, 123 -.
- 111.- B.M. Muller, J. Kraus y G. Franz (1989). Chemical structure and biological activity of water soluble polysaccharides from *Cassia angustifolia* leaves. Planta Medica 55, 493 -.
- 112.- B.M. Muller y G. Franz (1992). Chemical structure and biological activity of polysaccharides from *Hibiscus* sabdariffa. Planta Medica 58, 60 -.

- 113.- K.W. Nadharni (1954). Indian Materia Medica, Vol 1. Popular Book Depot, Bombay, India, página 1252.
- 114.- M.M. Nores, M.C. Courrèges, F. Benencia y F.C. Coulombié (1995). Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts. Trabajo enviado para su publicación al Journal of Ethnopharmacology.
- 115.- R.J. North (1978). The concept of the activated macrophage. Journal of Immunology 121 (1), 806 -.
- 116.- D.T. Okpako (1977). Prostaglandin synthetase inhibitory effect of *Azadirachta indica*. Journal of the West African Science Association 22, 45 -.
- 117.- S.N. Okpanyi y G.C. Ezeukuwu (1981). Anti-inflammatory and antipyretic activities of *Azadirachta indica*. Planta Medica 41, 34 -.
- 118.- L.R. Parodi (1959). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Acme, Buenos Aires, Argentina.
- 119.- 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.

- 120.- M.K. Patterson (1979). Measurement of growth and viability of cells in culture. Methods in Enzimology 58, 141 -.
- 121.- 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 -.
- 122.- N.R. Pillai y G. Santhakumari (1981). Antiarthritic and antiinflammatory action of nimbidin. Planta Medica 43, 59 -.
- 123.- N.R. Pillai y G. Santhakumari (1984). Effects of nimbidin on acute and chronic gastro-duodenal ulcer models in experimental animals. Planta Medica 50, 143 -.
- 124.- 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 -.
- 125.- P.M. Rademaker, H. Van Dijk y J.M.N. Willers (1981). Involvement of membrane-associated sialic acid in the resistance of sheep erythrocytes to lysis by mouse complement. Immunology Letters 3, 221 -.

- 126.- E.L. Ratera y M.O. Ratera (1980). Plantas de la Flora Argentina empleadas en medicina popular. Ediciones Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- 127.- I. Roesler, CH. Steinmuller, A. Kiderlen, H. Emmendorfer, H. Wagner y M.L. Lohmann-Matthes (1991). Application of purified polysacccharides fron cell cultures of the plant *Echinaea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. International Journal of Immunopharmacology 13 (1), 27 -.
- 128.- I.M. Roitt, J. Brostoff y D.K. Male (1993). Immunology. Mosby, Londres, Inglaterra.
- 129.- C. Rosales y E.J. Brown (1993). Neutrophil receptors and modulation of the immune response. The natural immune system: the neutrophil. Editado por J.S. Abramson y J.G. Wheeler, Oxford University Press, New York, USA.
- 130.- H. Rudiger (1982). Chemical examination of **Anacardium** occidentale Isolation and structure determination of a novel biflavonoid-glycoside. Planta Medica 45, 3 -.
- 131.- 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 -.

- 132.- J. Schalkwijk, W.B. van den Berg, L.B.A. van de Putte, L.A.B. Joosten y M. van der Sluis (1985). Effects experimental joint inflammation on bone marrow and periarticular bone. A study of two types of arthritis, using a inflammation. variable degrees of British Journal of Experimental Pathology 66, 435 -.
- 133.- M.H. Schreier, G. Zenke, J.F. Borel y G. Baumann (1992). The continuing search for new immunomodulators. Transplantation Proceedings 24 (4), 19 -.
- 134.- N. Shimizu, M. Tomoda, K. Takada y R. Gonda (1992). The core structure and immunological activities of Glycyrrhizan UA, the main polysaccharide from the root of *Glycyrrhiza uralensis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 40(8) 2125 -.
- 135.- S. Siddiqui y C.R. Mitra (1945). Utilization of Neem oil and its bitter constituents (nimbidin series) in the pharmaceutical industry. Journal of Scientific and Industrial Research 4, 5 -.
- 136.- K.A. Smith (1980). T-Cell Growth Factor. Immunological Reviews 51, 337 -.

- 137.- R. Sokal y F.J. Rohlf (1980). Biometry, W.H. Freeman and Company, Nueva York, USA.
- 138.- R. Srivastava (19890. Inhibition of neutrophil response by curcumin. Agent and Actions 28, 298 -.
- 139.- X. Sun, T. Matsumoto, H. Kiyohara, M. Hirano y H. Yamada (1991). Cytoprotective activity of pectic polysaccharides from the root of *Panax Ginseng*. Journal of Ethnopharmacology 31, 101 -.
- 140.- X. Sun, T. Matsumoto y H. Yamada (1992). Purification of an anti-ulcer polysaccharide from the leaves of *Panax ginseng*. Planta Medica 58, 389 -.
- 141.- K. Takada, M. Tomoda y N. Shimizu (1992). Core structure of Glycyrrhizan GA, the main polysaccharide from the stolon of Glycyrrhiza glabra var. glandulifera; anticomplementary and alkaline phosphatase-inducing activities of the polysaccharide and its degradation products. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 40(9), 2487 -.
- 142.- L.A. 't Hart, P.H. van Enckevort, H. van Dijk y R.P. Labadie (1988). Two functionally and chemically distinct

immunomodulatory compounds in **Aloe vera** gel. Journal of Ethnopharcology 23, 61 -.

143.- L.A. 't Hart, A.J.J. van der Berg, L. Kuis, H. van Dijk y R.P. Labadie (1989). An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of **Aloe vera**. Plata Medica 55, 493 -.

144.- M. Tomoda, N. Shimizu, Y. Oshima, M. Takahashi, M. Murakami y H. Hikino (1987). Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. Planta Medica 1, 8 -.

145.- M. Tomoda, R. Gonda, N. Shimizu y H. Yamada (1989). An anticomplementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. mauritiana. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 37(11), 3029 -.

146.- M. Tomoda, N. Shimizu, R. Gonda y M. Kanari (1989). Anticomplementary and hypoglycemic activity of Okra and Hibiscus mucilages. Carbohydrate Research 190, 323 -.

147.- M. Tomoda, N. Shimizu, R. Gonda, M. Kanari y H.Yamada (1990). Anti-complementary and hypoglycemic activities of the glycans from the seeds of *Malva verticillata*. Planta Medica 56, 168 -.

- 148.- M. Tomoda, H. Asahara, R. Gonda y K. Takada (1992). Constituents of the seed of *Malva verticillata*. VIII. Smith degragation of MVS-VI, the major acidic polysaccharide, and anti-complementary activity of products. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 40(8), 2219 -.
- 149.- M. Tomoda, N. Ohara, R. Gonda, N. Shimizu, K. Takada, Y. Satoh y S. Shirai (1992). An acidic polysaccharide having immunological activities from the rhizome of *Cnidium* officinale. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 40(11), 3025-.
- 150.- G. Uhlenbruck (1981). Lectins, toxins and immunotoxins. Naturwissenschaften 68, 606 -.
- 151.- 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 -.
- 152.- 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 -.

- 153.- 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 chemiluminiscence production by activated human polymorphonuclear leukocytes. Planta Medica 57, 65 -.
- 154.- H. Van Dijk, P.M. Rademaker y J.M.N. Willers (1980). Determination of alternative pathway of complement activity in mouse serum using rabbit erythrocytes. Journal of Immunological Methods 36, 29 -.
- 155.- H. Van Dijk, P.M. Rademaker y J.M.N. Willers (1980). Estimation of classical pathway of mouse complement activity by use of sensitized rabbit erythrocytes. Journal of immunological Methods 39, 2517 -.
- 156.- J. Varlen, A. Liptak y H. Wagner (1989). Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immunostimulating activity from *Calendula officinalis*. Phytochemistry 28(9), 2379 -.
- 157.- M. Wachsman, 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 -.

- 158.- M. Wachsman, 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 -.
- 159.- H. Wagner, B. Kreutzkamp y K. Jurcic (1985). Alkaloids from *Uncaria tormentosa* and their phagocytosis-increasing effect. Planta Medica 419 -.
- 160.- H. Wagner y A. Proksch (1985). Immunostimulatory drugs of fungi and higher plants. Economic and Medicinal Plant Research 1, 113 -.
- 161.- 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 -.
- 162.- H. Wagner y A. Proksch (1987). Structural analysis of a 4-o-methylglucoronoarabinoxylan with immunostimulating activity from *Echinacea purpurea*. Phytochemistry 26, 1989 -.
- 163.- H. Wagner, U. Knaus y E. Jordan (1987). Pflanzeninhaltsstoffe mit Wirkung auf das Komplement-system. Zeitschrift furr Phytotherapie 8, 148 -.

- 164.- H. Wagner y H. Reger (1987). Radix Primulae-Extrakte, HPLC-Analyse. Deutsche Apotheker Zeitung 126, 2631 -.
- 165.- H. Wagner, M. Wierer y B. Fessler (1987). Effects of garlic constituents on arachidonate metabolism. Planta Medica 55, 305 -.
- 166.- H. Wagner y E. Jordan (1988). An immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* berries. Phytochemistry 27, 2511 -.
- 167.- H. Wagner, B. Kreher y K. Jurcic (1988). "In vitro" stimulation of human granulocytes and lymphocytes by pico and fentogram quantities of cytostatic agents. Arzneimittel-forshung/ Drug Research 38, 276 -.
- 168.- H. Wagner, H. Stuppner, W. Schafer y M. Zenk (1988). Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. Phytochemistry 27, 119 -.
- 169.- H. Wagner (1989). Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. Planta Medica 55, 235 -.
- 170.- 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 -.

- 171.- H. Wagner (1990). Search for plant derived natural products with immunostimulating activity (recent advances). Pure and Applied Chemistry 62, 1217 -.
- 172.- H. Wagner y K. Jurcic (1991). Methods in Plant biochemistry. Vol 6. Capítulo 8: Assays for immunomodulation and effects on mediators of inflammation pp. 195 215. Academic Press.
- 173.- H. Wagner (1993). Leading structures of plant origin for drug development. Journal of Ethnopharmacology 38, 105 -.
- 174.- D.M. Weir (1983). Handbook of Experimental Immunology, Volumen II, Oxford, Inglaterra.
- 175.- B. Wickberg (1993). Chemical methods in ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology 38, 159 -.
- 176.- P.C. Wilkinson (1981). Neutrophil function test. En: Techniques in Clinical Immunology. R.A. Thompson (Ed), Blackwell Scientific Publications USA, página 273.

- 177.- 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 Researh 38, 661 -.
- 178.- 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.
- 179.- H. Yamada, H. Kiyohara, J. Cyong, Y. Kojima, Y. Kumazawa y Y. Otsuka (1984). Studies on polysaccharides from *Angelica* acutiloba. Planta Medica 2, 163 -.
- 180.- H. Yamada, H. Kiyohara, J. Cyong y Y. Otsuka (1985). Studies on polysaccharides from **Angelica acutiloba** IV. Characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of **Angelica acutiloba** Kitagawa. Molecular Immunology 22(3), 295 -.
- 181.- H. Yamada, T. Nagai, J. Cyong, J. Otsuka, M. Tomoda, N. Shimizu y K. Shimada (1985). Relationship between chemical structure and anticomplementary activity of plant polysaccharides. Carbohydrate research 144, 101 -.

- 182.- H. Yamada, K. Ohtani, H. Kiyohara, J. Cyong, Y. Otsuka, Y. Ueno y S. Omura (1985). Purification and chemical properties of anticomplementary polysaccharides from the leaves of **Artemisia princeps**. Planta Medica 2, 121 -.
- 183.- H. Yamada, T. Nagai, J. Cyong y Y. Otsuka (1986). Relationship betwen chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, plantago mucilage A, from the seed of *Plantago asiatica*. Carbohydrate Research 156, 137 -.
- 184.- H. Yamada, Y. Otsuka y S. Omura (1986). Structural characterization of anticomplementary polysaccharides from the leaves of *Artemisia princeps*. Planta Medica 4, 311 -.
- 185.- H. Yamada, H. Kiyohara, J. Cyong y Y. Otsuka (1987). Structural characterization of anti-complementary arabinogalactan from the roots of **Angelica acutiloba** Kitagawa. Carbohydrate Research 159, 275 -.
- 186.- H.Yamada, S. Yanahira, H. Kiyohara, J. Cyong y Y. Otsuka (1987). Characterization of anti-complementary acidic heteroglycans from the seed of *Coix lacrima-jobi* var. *Ma-yuen*. Phytochemistry 26(12), 3269 -.

- 187.- 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.
- 188.- H. Yamada, K. Ra, H. Kiyohara, J. Cyong y Y. Otsuka (1989). Structural characterization of anticomplementary pectic polysaccharide from the roots of **Bupleurum falcatum** L. Carbohydrate Research 189, 209 -.
- 189.- H. Yamada, H. Kiyohara, J. Cyong, N. Takemoto, J. Konatsu, н. Kawamura, Μ. Obusada y E. Kosoya (1990). Fractionation and characterization οf mitogenic and anticomplementary active fractions from Kampo (Japanase Herbal) medicine "Juzem-Taiho-to". Planta Medica 56, 386 -.
- 190.- H. Yamada, T. Nagai, J. Cyong y Y. Otsuka (1991). Mode of complement activation by acidic heteroglycans from the leaves of *Artemisia princeps* pamp. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 39 (8), 2077 -.
- 191.- Y. Yoshikai, S. Miake, T. Matsumoto, K. Nomoto y K. Takeya (1979). Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed foodpad reaction to SRBC in mice. Immunology 38, 577 -.

192.- Q. Zhao, H. Kiyohara, T. Nagai y H. Yamada (1992). Structure of the complement-activating proteoglycan from the pilose antler of *Cervus nippon* Temminck. Carbohydrate research 230, 361 -.