



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Hugo Folch V.
INSTITUTO : Inmunología
FACULTAD : Medicina

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Rafael Burgos A.
INSTITUTO : Farmacología
FACULTAD : Medicina Veterinaria

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS ANDROGRAFOLIDO Y 14-DEOXIANDROGRAFOLIDO EN LA ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS B POR LIPOPOLISACÁRIDO DE *Salmonella enteritidis*”.

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico.

EVELYN ROSEMARIE SCHWENKE HOFFMANN

VALDIVIA-CHILE

2006

Dedicado a mis padres Martin y Valeria,

a mi compañero de vida Luis

y a mis hermanas Cindy y Macarena

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en forma muy especial a los profesores Hugo Folch, Rafael Burgos y Juan Luis Hancke quienes me hicieron partícipe del proyecto Fondecyt D0111024, haciendo de esta manera posible el desarrollo de mi trabajo de investigación que concluye con esta tesis.

Al Dr. Hugo Folch, por su apoyo y confianza durante todo el desarrollo de mi tesis. Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia a través de enriquecedoras discusiones, muchas correcciones y exigencia en la calidad de mis conclusiones.

Un agradecimiento muy sentido para mi escuela de Química y Farmacia, representada en todas las personas que la integran. Con ellas crecí y me sentí permanentemente apoyada.

A todas las personas que trabajan en el Instituto de Inmunología por su colaboración constante e importantes consejos.

A mis padres por su amor incondicional, por estar siempre presentes y haberme ayudado a seguir este camino durante todos estos años.

A Luis quien cambió mi vida con sólo ser parte de ella y me hizo ver que no hay nada imposible, sólo momentos difíciles. Gracias por el amor y la paciencia que has tenido.

A mis hermanas por su gran cariño, alegría, amistad, comprensión y por creer en mí.

A Carla en quien encontré una muy buena y leal amiga, por escucharme, acompañarme y darme ánimo para esforzarme más.

A Marcela que me brindó respaldo y una sincera amistad en esos momentos más solos y difíciles, dándome valor para seguir adelante.

Finalmente a todas aquellas personas que estuvieron cerca y que de alguna manera ayudaron a concretar este gran proyecto, infinitas gracias.

Índice

	Pág.
Resumen	2
Summary	3
Introducción	4
Materiales y Métodos	11
Resultados	15
Discusión	27
Conclusión	29
Bibliografía	30

1. Resumen

1.1- Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto de los principios activos Andrografolido y 14-Deoxiandrografolido (14-DAP) de *Andrographis paniculata*, en la estimulación de linfocitos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Para realizar este estudio se utilizaron las células del bazo de ratones RK y C57 black o de ratas *Sprague dawley*. Para lograr este objetivo se usó la técnica de transformación blástica, que consistió en hacer cultivos celulares estimulados o no con lipopolisacárido (LPS) y el principio activo en concentraciones crecientes. Los linfocitos se cultivaron por 48 horas a 37° C, luego, cada cultivo recibió 0,5 µCi de timidina tritiada, fueron cultivadas por 24 horas adicionales y por último se evaluó la incorporación del ADN de las células en cultivo. Además, en una serie experimental los animales en estudio se inocularon por 6 días consecutivos con el principio activo en concentraciones diferentes, luego los animales fueron sacrificados, se extrajo el bazo y los linfocitos esplénicos fueron cultivados siguiendo la técnica antes mencionada. Los resultados obtenidos mostraron que andrografolido administrado solo a células esplénicas “*in vitro*”, aumenta la síntesis de ADN. Este efecto no se observó en las células estimuladas por el LPS. Por otro lado, el extracto de *Andrographis paniculata* administrado “*in vivo*” causó una disminución de la respuesta linfoblástica en las células estimuladas “*in vitro*” con LPS. El 14-DAP generó una moderada disminución de la síntesis de ADN en cultivos estimulados con LPS.

1.2- Summary

In this work the effect of andrographolide and 14-deoxyandrographolide (14-DAP) in the DNA synthetic response of B cells was investigated. These two molecules were obtained from *Andrographis paniculata*, used in Asia as herbal medicine since ancient times. There are many reports in relation with the immune-stimulatory effect of *Andrographis paniculata* extract and several studies on the effect of andrographolide, which is a diterpenic labdane present in high quantity in the aerial part of the plant. The specific aim of this work was to investigate the possible stimulant role of andrographolide and 14-DAP in the B cell when is stimulated “*in vitro*” by lipopolisacaride (LPS). With this purpose, spleen cells from *Sprague Dawley* rats, *RK* or *C₅₇BL* mice were obtained and cultured in presence or absence of the molecules under study, with or without LPS as stimulant. In order to evaluate the spontaneous DNA synthesis or the blast transformation induced by LPS, the cultures were pulsed with tritiated thymidine, the cells harvested and the incorporation of the radiolabelled nucleotide evaluated in a β -counter. The results were expressed as counts per minute (cpm) in some cases, and in others as Stimulation Index which is the reason of the cpm of the experimental group divided by the cpm obtained in the control group. The results indicate that “*in vitro*”, andrographolide alone, in a very narrow dose, was able to stimulate DNA synthesis in cultures with no extra-stimulus, but when the cultures were stimulated with LPS, this stimulatory effect disappeared. In animals in which *Andrographis paniculata* extract was given “*in vivo*”, the stimulation of B cells by LPS was lower than in the control lymphocytes obtained from non injected animals. On the other hand, 14-DAP shows a negative effect in the LPS stimulation of B cells using our experimental system.

2. Introducción

Las plantas constituyen una fuente natural de un sin número de principios activos, por esto, desde tiempos inmemoriales han sido utilizadas en la elaboración de preparados con virtudes curativas. Es suficiente recordar que los vegetales fueron los primeros medicamentos utilizados por el hombre para intentar aliviar el sufrimiento físico y curar sus enfermedades. La historia nos permite conocer cual ha sido el aporte, en este aspecto, del reino vegetal a lo largo del tiempo y a través de todas las culturas; por ejemplo hay evidencias en donde figuran nombres y descripciones de sustancias naturales para uso terapéutico, especialmente vegetales, o formulaciones y formas de administración que datan de más de 4000 años de antigüedad como son las tablillas de Nippur, que es una colección de prescripciones que constituye el texto médico más antiguo que se conoce. Por otro lado, los “pen-t’sao” chinos recogen el estudio de más de 300 plantas de uso medicinal y el papiro egipcio descubierto en 1872 por el arqueólogo George Ebers y que data del año 1500 AC., contiene 811 prescripciones y cita 700 fórmulas distintas para obtener efectos curativos. En India el uso de plantas medicinales nos ha dejado referencias escritas del año 800 AC donde aparece descrito el uso terapéutico de más de 800 especies vegetales. También hay documentos en este sentido dejados por los Incas, Mayas y Aztecas (Montes *et al*, 1992).

Estos trabajos antiguos, tenían como base la corroboración empírica del valor terapéutico de las plantas y a su utilidad real se le sumaba la creencia en elementos de carácter mágico. Hoy se piensa que la capacidad medicinal de las plantas depende de una suma de factores, entre los cuales destaca en forma importante la efectividad de los principios activos que contiene. La

investigación química y farmacológica ha permitido descubrir una variada gama de ellos con un claro valor medicinal (Montes *et al*, 1992).

En el presente trabajo nos abocaremos al estudio de dos principios activos presentes en un extracto de *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. Esta es una planta originaria de Asia, principalmente China, India y Corea. Pertenece a la familia Acantaceae, es un arbusto anual y puede alcanzar a medir un metro de altura. El extracto seco de hojas y tallos se ha utilizado tradicionalmente en la medicina china como tónico para el tratamiento de cólicos, problemas intestinales en niños, desórdenes del hígado, debilidad general, herpes, fiebre, infecciones respiratorias superiores y una variedad de otras enfermedades infecciosas (Puri *et al*, 1993; Tang y Eisembrand, 1992). Esta planta también se encuentra descrita en la farmacopea India en al menos 26 fórmulas. Históricamente fue usada en 1919 en la epidemia de gripe de dicho país durante la cual se popularizó por creerse que detuvo la propagación de la enfermedad. De la misma forma, en Chile un estudio realizado en la zona central de nuestro país durante el invierno demostró que el riesgo relativo de contraer un resfrío común disminuye cuando se consume *Andrographis paniculata*, con respecto del grupo placebo (Cáceres *et al*, 1997).

Aproximadamente hace 50 años comenzaron a realizarse diversos estudios para determinar el origen de sus propiedades. De acuerdo a estos, se comprobó que las partes aéreas de *Andrographis paniculata*, hojas y tallos, contienen los fitoquímicos activos que son extraídos con alcohol o soluciones alcalinas. Los principales compuestos que es posible obtener de dicha planta son lactonas diterpénicas y sesquiterpénicas, flavonoides y azúcares. De los constituyentes diterpénicos identificados el más estudiado es el andrografolido, y otros relacionados estructuralmente como deoxi-didehidroandrografolido, deoxi-oxoandrografolido, deoxi-

andrografolido, dideoxi-andrografolido, andrografisido y 14-deoxiandrografolido (Tang y Eisenbrand, 1992).

En base a los antecedentes de las virtudes curativas expuestas anteriormente, se han realizado diversos estudios preclínicos y clínicos para identificar y dilucidar sus propiedades farmacológicas. Para realizar estos ensayos se han utilizado tanto el extracto crudo de *Andrographis paniculata*, como el andrografolido purificado por ser este principio activo al que se le atribuye el efecto beneficioso de la planta y el que se encuentra en mayor concentración (Thamlikitukul *et al*, 1991). En estudios preclínicos, el extracto de la planta ha mostrado diversas actividades, tales como actividad antidiarreica en modelos animales tratados con enterotoxina de *Echerichia coli* (Gupta *et al*, 1990), efecto hepatoprotector administrado intraperitonealmente en ratas (Sharma *et al*, 1991) e inmunoestimulantes en ratones BALB/c (Puri *et al*, 1993). El andrografolido adicionalmente ha mostrado tener acción colerética administrado en ratas (Tripathi y Tripathi, 1991) y antihepatotóxica en ratones (Kapil *et al*, 1993). Otro principio activo, menos estudiado, es el 14-deoxiandrografolido, que al igual que el andrografolido también es una lactona diterpénica. Este compuesto ha mostrando propiedades antiinflamatorias y antipiréticas (Zhang y Tan, 1998), un efecto hipotensor (Zhang *et al*, 1998) y una moderada actividad en la diferenciación celular en ratones con leucemia mieloide (Singh *et al*, 1998).

Este estudio centrará sus esfuerzos en investigar el efecto de *Andrographis paniculata* en la rama humoral de la respuesta inmune y más precisamente su efecto en las células B productoras de anticuerpos. Al respecto, el sistema inmune constituye la forma más evolucionada de defensa y protección para los individuos. Posee tres características fundamentales las cuales son: especificidad, memoria y reconocimiento de lo propio. La respuesta inmune específica o adaptativa esta compuesta de dos mecanismos principales: inmunidad celular e inmunidad

humoral. (Diasio y LoBuglio, 1996). Ambas son mediadas por linfocitos que tienen su origen en las células madres hematopoyéticas ubicadas en la médula ósea, pero que antes de ser plenamente activos deben pasar una etapa de maduración en los órganos linfoides centrales, diferenciándose a linfocitos T o linfocitos B, responsables de la respuesta inmune celular y humoral, respectivamente (Roitt *et al*, 1997).

Los linfocitos T, mediadores de la inmunidad celular, reconocen el antígeno mediante un receptor TCR a través de una célula presentadora que lo dispone sobre las moléculas de histocompatibilidad de su membrana, adicionalmente las células T también cumplen una función reguladora, mediante la cual favorecen o inhiben la respuesta inmune (Roitt *et al*, 1997). De acuerdo a esto, las células derivadas del timo se pueden clasificar en linfocitos T helper 1 (TH₁) que son los encargados de activar la respuesta inmune celular contra los distintos antígenos y los linfocitos T helper 2 (TH₂) que son efectivos en la estimulación del crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, por lo tanto encargados de modular en forma positiva la respuesta inmune humoral (Vergara, 1998).

Los linfocitos B, poseen inmunoglobulinas como receptores para el antígeno en su membrana, estas son semejantes a las inmunoglobulinas circulantes, tanto por sus propiedades fisicoquímicas como de su capacidad de unirse específicamente a los determinantes antigénicos (Diasio y LoBuglio, 1996). Cuando el antígeno se une a la célula B, ésta es estimulada para dividirse y algunas de sus células hijas se transforman en células plasmáticas con la capacidad de secretar grandes cantidades de anticuerpos hacia la circulación general. Los linfocitos B, mediante estos receptores son capaces de reconocer una infinidad de determinantes antigénicos diferentes, lo cual otorga al sistema inmune la potencialidad de responder contra cualquier antígeno complejo (Córdova *et al*, 1994).

Una forma de evaluar la capacidad de respuesta de los linfocitos en general es la prueba de transformación blástica que consiste en evaluar la capacidad de las células linfoides de sintetizar ADN en un ensayo “*in vitro*”, proporcionando un índice de su capacidad de respuesta, en un determinado individuo o en una población determinada. Es comúnmente utilizada para valorar la inmunidad celular en pacientes con inmunodeficiencias o enfermedades infecciosas, evaluando en este caso, la población de las células T, mediante la estimulación con antígenos específicos o mitógenos inespecíficos capaces de activar la totalidad de los linfocitos T. De igual manera puede hacerse con los linfocitos B, usando los estimulantes adecuados, estos son en general antígenos timo independientes o activadores policlonales de las células B (Fletcher *et al.*, 1997).

En roedores la transformación blástica se puede realizar obteniendo células de ganglios o bazo. En este estudio se utilizó el bazo como fuente de linfocitos. Entre los mitógenos más comúnmente empleados en esta técnica están los de origen vegetal como fitohemaglutinina (PHA) y concavalina A (ConA) que estimulan células T y el “pokeweed mitogen” (PWM) que estimula células B y T (Abbas *et al.*, 1998). Entre los mitógenos de origen microbiano se encuentra el lipopolisacárido (LPS) que es un componente integral de la membrana externa de la pared celular de las bacterias gramnegativas, que fue utilizado en los experimentos de este estudio puesto que estimula exclusivamente células B de una manera timo independiente. El LPS está formado por un fosfoglicolípido anclado a la membrana bacteriana, lípido A, unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, que le confiere la actividad biológica a la molécula (Bermejo y Duarte, 2003).

Los cambios que se producen en la célula cuando ocurre la activación linfocitaria, mediada por antígenos o mitógenos, incluyen síntesis de proteínas, ARN y ADN, además de

cambios morfológicos como aumento del citoplasma. De esta forma, evaluando alguna de estas actividades es posible medir la capacidad funcional de linfocitos T o B para proliferar en respuesta al estímulo al que ha sido expuesto. El sistema más ampliamente usado para medir la proliferación linfocitaria es incorporando un nucleótido marcado con un isótopo radioactivo como Timidina tritiada (ThyH³) al ADN celular. Como los linfocitos activados tienden a dividirse y esa división celular requiere síntesis de ADN, se provee el cultivo en estudio con una fuente exógena de nucleótidos marcados para que los linfocitos lo internalicen e incorporen a su ADN. La evaluación cuantitativa de la respuesta “*in vitro*” así originada se realiza midiendo el incremento de la duplicación de ADN, de tal modo que las células estimuladas incorporen el nucleótido radioactivo y su acumulación en el cultivo se transforme en un índice de actividad mitótica. La cantidad de radioactividad en las células del cultivo será proporcional a la frecuencia de la duplicación del material nuclear, lo cual se determina en un contador de emisiones beta (Fletcher *et al.*, 1997).

En base a los antecedentes expuestos se ha formulado la siguiente Hipótesis de trabajo:

“Andrografolido y 14-deoxiandrografolido, potencian la respuesta inmune humoral y por tanto es probable que aumente la transformación blástica inducida por LPS en células B”.

Se ha fijado como objetivo general demostrar que andrografolido y 14-deoxiandrografolido son capaces de aumentar la actividad de las células B “*in vitro*” e “*in vivo*”.

Los objetivos específicos son:

- Determinar el efecto de andrografolido en la síntesis de ADN espontánea en cultivos no estimulados por el mitógeno.

- Determinar el efecto de andrografolido en la síntesis de ADN de las células B estimuladas por LPS.
- Determinar el efecto de 14-deoxiandrografolido en la síntesis de ADN espontánea en cultivos no estimulados por el mitógeno.
- Estudiar el efecto de 14-deoxiandrografolido en la transformación blástica de linfocitos de ratón inducidos por LPS.
- Estudiar el efecto en la transformación blástica inducida por LPS en ratones inyectados “*in vivo*” con el extracto de *Andrographis paniculata*.

3. Materiales y métodos

3.1.- Animales

Como animales de experimentación se utilizaron ratones de la cepa Rockefeller (RK) y C57 black (C₅₇BL), provenientes del vivero del Instituto de Inmunología y ratas de la cepa Sprague Dawley provenientes del Instituto de Fisiología de la Universidad Austral de Chile. Los animales utilizados en cada experimento fueron del mismo sexo y edad. Los animales experimentales se mantuvieron siempre en cajas a una temperatura de 20° C, alimentados con concentrado especial para ratones y agua “*ad libitum*”.

3.2.- Medio de cultivo

En todos los experimentos realizados se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma chemical Co, USA) esterilizado por medio de filtración antes de su uso. Para los cultivos celulares y preparación de los estándares, se utilizó RPMI 1640 completo el cual se preparó bajo una cámara de flujo laminar (Heraeus Lamin Air TL 2448) con RPMI 1640 estéril al cual se le adicionó Anfotericina-B 1%, Piruvato 1%, 2-Mercaptoetanol 1%, Penicilina-estreptomina 1% (Sigma chemical Co, USA) y que se suplementó adicionalmente con 10 % de Suero Bovino Fetal estéril (Hyclone).

3.3.- Obtención de células linfoides y suspensiones celulares

Para obtener linfocitos en gran cantidad, se utilizó el bazo de los animales de experimentación. Para esto, los ratones fueron sacrificados por inhalación excesiva de éter, se obtuvo el bazo el que fue puesto en una placa Petri con 5 ml de medio RPMI 1640, luego fue

disgregado y la suspensión celular fue puesta en un tubo, allí se dejó decantar para eliminar los trozos de tejido. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 100 µl la que se diluyó 1:9 en solución Hayem II. Dicha solución destruye los eritrocitos y fija a los linfocitos, para así poder cuantificarlos en una cámara de Neubauer siguiendo la técnica convencional. Una vez que se sabe el número de células de la suspensión, el número de linfocitos se ajustó a 4×10^6 células por ml en RPMI 1640.

3.4.- Principio Activo

En los experimentos se trabajó con andrografolido y 14-deoxiandrografolido, compuestos aislados de *Andrographis paniculata*, adquiridos al Laboratorio Amsar Private Ltda. Dichos principios activos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (Laboratorios Merck) y luego diluidos en medio de cultivo RPMI 1640 completo para obtener los estándares en concentraciones de 0,0025; 0,025 y 0,25 µM, que fueron utilizados por separado en cultivos celulares. Además se hizo un grupo control constituido sólo por el solvente.

En otro modelo experimental realizado “*in vivo*”, se usó el extracto seco de *Andrographis paniculata* que contiene $6,11 \pm 0,28$ % p/p de andrografolido (Swedish Herbal Institute, Suecia) con el cual se trataron los animales experimentales que posteriormente fueron dadores de células linfoides para realizar los cultivos. Para este propósito se utilizaron dosis de 30, 3 y 0,3 mg/kg del extracto diluidos en etanol al 0,008 %. Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 200 µl de cada dosis por seis días consecutivos. Además se hizo un grupo control de ratones inyectados sólo con el solvente.

3.5.- Mitógeno

En la estimulación “*in vitro*” para los linfocitos de bazo se utilizó como mitógeno Lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella enteritidis* (Sigma chemical Co, USA) en concentraciones crecientes de 0,25 a 15 µg/ml.

3.6.- Técnica de cultivo y procesamiento de las muestras

Para realizar el método de transformación blástica, se utilizó la suspensión celular ajustada a 4×10^6 células por ml. Alícuotas de 100 µL de esta suspensión se sembraron en cada uno de los pocillos en las placas de cultivo celular de 96 pocillos (Falcon). Estos pocillos recibieron posteriormente concentraciones crecientes y conocidas de LPS y el principio activo en estudio, siempre manteniendo pocillos controles. Las células se cultivaron a 37 °C, en una estufa (Heraeus) con atmósfera de CO₂ al 5% por 48 hrs y luego se agregó un pulso de 0,5 µCi de Timidina Tritiada (Amersham biociences, UK) a cada pocillo, con el fin de medir la replicación del ADN celular. Las células se cultivaron por 24 horas más y luego se procedió a la cosecha de las células con el ADN marcado, utilizando para ello una máquina cosechadora de células (Multimash 2000 Dynatech) que depositó el cultivo en un filtro de lana de vidrio. Cada fracción de papel filtro fue puesto en forma individual en viales de centelleo a los cuales se les adicionó 6 mL de solución de centelleo o Ecosint (Fermelobiotec). Luego los viales fueron puestos y analizados en un contador de emisiones beta, el cual entrega los resultados en cuentas por minuto (CPM).

3.7.- Índice de transformación blástica

El índice de transformación blástica o índice de estimulación (IE) es la razón entre las CPM del cultivo experimental dividido por las CPM del cultivo control. En este caso el “cultivo control” correspondió al cultivo sin principio activo estimulado o no por LPS y los experimentales aquellos incubados con mitógeno o no pero en presencia de principio activo. En todos los experimentos realizados el IE se calculó individualmente, luego los resultados de 3 a 5 experimentos se promediaron obteniendo un solo gráfico representativo, para así evaluar la existencia o no de estímulo con el principio activo.

3.8.- Expresión de los resultados

Los resultados del recuento de los leucocitos fueron expresados en número de células por ml. La cantidad de Timidina tritiada (^3H) incorporada en las células se expresó en cuentas por minuto (CPM) y los resultados en los gráficos es el promedio de datos de los cultivos hechos por triplicado bajo las mismas condiciones experimentales.

Los gráficos de barra con sus respectivas desviaciones estándares fueron realizados con el programa GRAPH PAD PRISM 3.0

4. Resultados

4.1.- Efecto de andrografolido en la respuesta blastogénica de células linfoides.

Como se mencionó anteriormente un método para medir la capacidad de los linfocitos al ser estimulados es la prueba de transformación blástica, evaluando la síntesis del ADN de los linfocitos B cuando son incubados “*in vitro*” con un mitógeno inespecífico, como es el caso del lipopolisacárido (LPS). Para esto, las células linfoides obtenidas de bazo de ratón RK fueron cultivadas por 72 horas en medio RPMI 1640 completo con andrografolido en concentraciones de 0,00; 0,05; 0,50 y 5,00 nM y estimuladas con 1,5; 5,0 y 15,0 µg/ml de LPS. Tal como se muestra en la Figura 1, podemos observar que las células tratadas con 0,5 nM de andrografolido y sin el mitógeno LPS, son las únicas en que el principio activo genera un aumento de la incorporación de Timidina tritiada (ThyH³), no observándose este efecto en los cultivos estimulados con LPS y tampoco en sus controles sin LPS pero con otras dosis de andrografolido, situación que se repitió en forma constante en cuatro experimentos similares realizados en diferentes fechas y bajo las mismas condiciones.

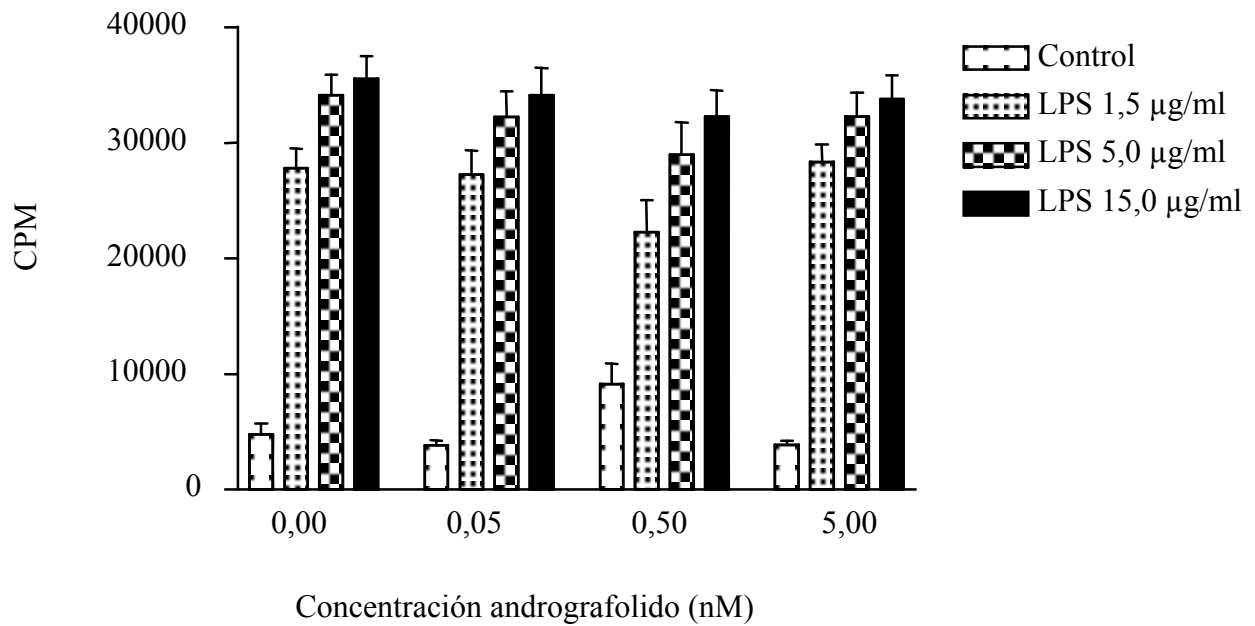


Figura 1: Incorporación de ThyH³ en linfocitos de bazo de ratón RK, cultivados con andrografolido, estimulados con LPS en concentraciones crecientes y mantenidos “*in vitro*” por 72 horas. En el gráfico cada una de las barras representa el resultado promedio de un total de cuatro experimentos, cada uno realizado por triplicado, con su respectiva desviación estándar.

4.2.- Determinación del índice de estimulación en los ensayos realizados con células linfoides tratadas con andrografolido.

Luego de obtener los resultados de cuatro experimentos, realizados de la manera como se describió anteriormente, se procedió a calcular para cada uno de ellos el IE y luego sacar un promedio de éste. En el gráfico de la Figura 2 se muestra el promedio de los índices de estimulación (IE), con el cual se confirma que el principio activo produce un aumento del IE sólo en ausencia de LPS y a una concentración de 0,50 nM, lo que demuestra la validez de la Figura 1.

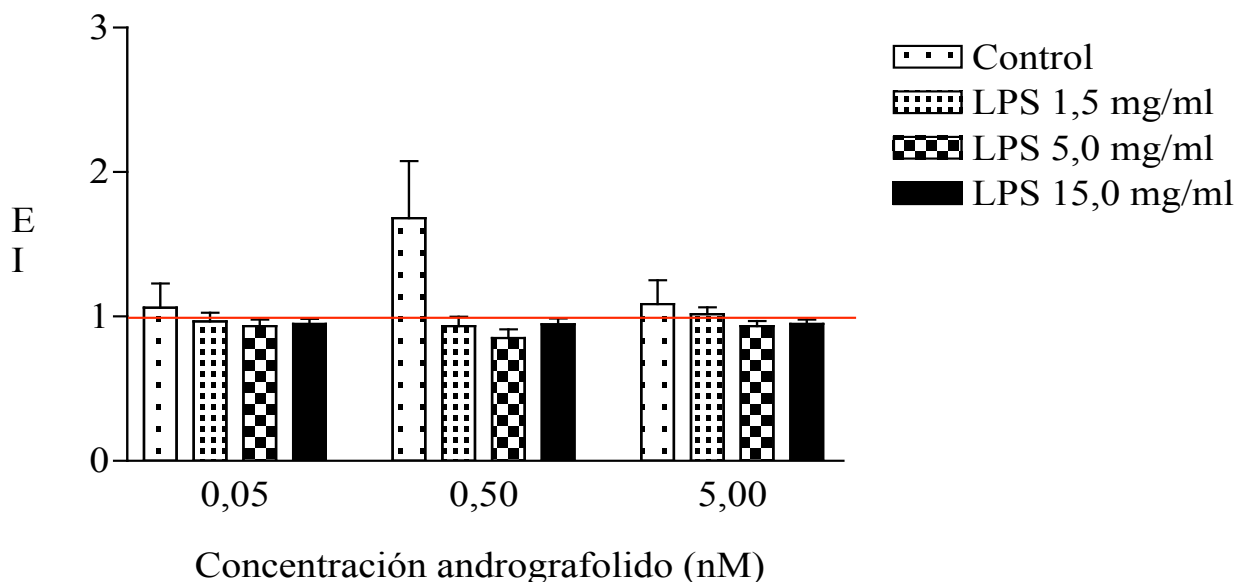


Figura 2: Índice de estimulación de linfocitos esplénicos de ratón RK, cuando están cultivados en presencia de andrografolido, solos o con distintas concentraciones de LPS. El IE fue calculado como la razón entre las CPM de los cultivos con el principio activo dividido por aquellos efectuados en su ausencia. Cada barra representa el promedio de cuatro valores con sus respectivas desviaciones estándares.

4.3.- Determinación de la mejor concentración estimulante de andrografolido.

Habiéndose demostrado que andrografolido administrado "*in vitro*" en ausencia de LPS es capaz de estimular la síntesis de ADN en linfocitos de ratón, se efectuó en esta condición un estudio de dosis, para esto se realizaron tres experimentos cultivando células esplénicas de ratón RK con concentraciones crecientes y conocidas de dicho principio activo. Para cada uno de los grupos experimentales y en cada uno de los experimentos, se determinó el IE, estos fueron promediados y obtenida la desviación estándar para cada grupo. Como puede verse en la Figura 3 cuando las células linfoides se cultivan sin LPS en presencia de diferentes cantidades de andrografolido se puede observar un aumento máximo de la síntesis de ADN a la concentración de 0.3125 nM.

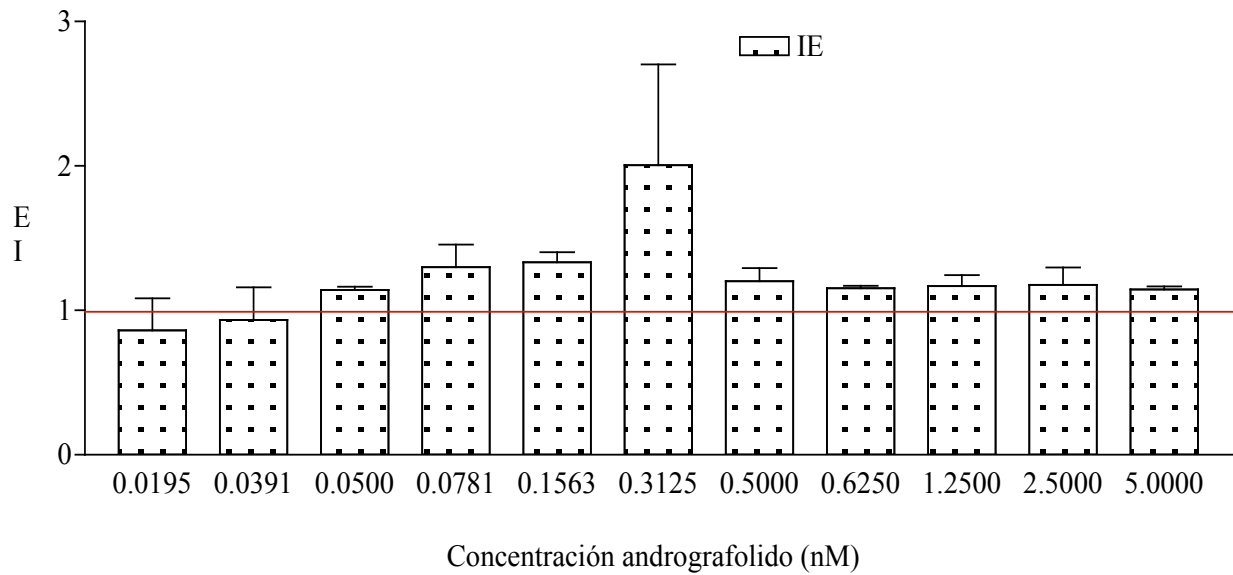


Figura 3: Índice de transformación blástica de células esplénicas de ratón RK, basado en tres experimentos y calculado como la razón entre las CPM de los cultivos en presencia de diferentes concentraciones de andrografolido y las CPM de aquellos efectuados en su ausencia. Cada una de las barras representa el promedio del índice de estimulación del principio activo con sus respectivas desviaciones estándares.

4.4.- Efecto de andrografolido en la síntesis de ADN en cultivos sin estímulo usando linfocitos de dos cepas de ratón y linfocitos de rata.

Con el fin de observar si existía alguna diferencia en la capacidad de estimular los linfocitos en dos cepas de ratón y una de rata, se realizaron dos experimentos en las mismas condiciones de los anteriores, en cada uno de los casos los animales fueron sacrificados, se les extrajeron los linfocitos del bazo y se cultivaron con andrografolido en concentración de 0,3125 nM y en ausencia del principio activo. Tal como se muestra en la figura 4, el efecto que se obtiene a la concentración de 0.3125 nM es similar en las 3 cepas, lo que demuestra la validez de los resultados.

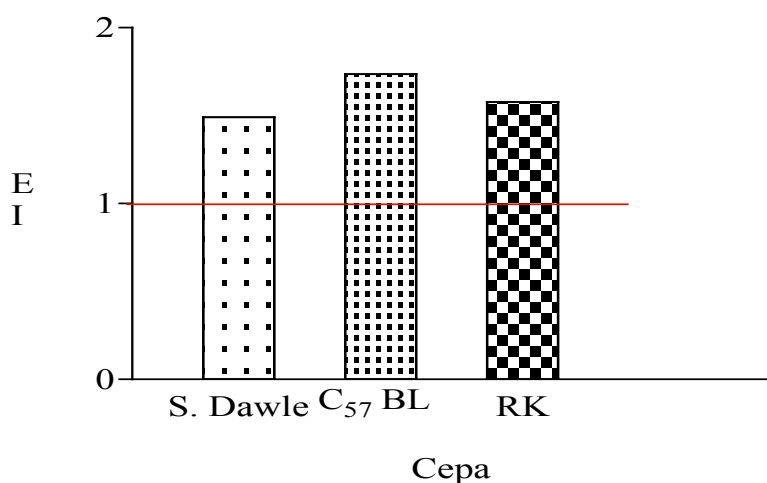


Figura 4: Índice de transformación blástica de células linfoides obtenidas de bazo de ratas *Sprague dawley* y de ratones RK o C₅₇ BL, cultivadas en ausencia o presencia de andrografolido. En el gráfico, cada una de las barras representa el resultado del índice de estimulación del principio activo en cada cepa.

4.5.- el extracto de *Andrographis paniculata* administrado “*in vivo*” induce una disminución de la respuesta blastogénica en cultivos estimulados o no estimulados con LPS.

Esta serie experimental se realizó con la finalidad de observar el efecto del principio activo administrado “*in vivo*” en la blastogénesis de las células B. Para esto se trabajó con cuatro grupos de ratones, cada uno de los cuales fue tratado por vía intraperitoneal seis días consecutivos con dosis de 0,0; 0,3; 3,0 y 30,0 mg/kg del extracto seco de *Andrographis paniculata*. El extracto administrado contenía 6,11 % de principio activo, por lo tanto la concentración de andrografolido administrada a cada grupo de ratones fue de 0,008; 0,080 y 0,800 μ M respectivamente. Al séptimo día fueron sacrificados y se les extrajo el bazo para obtener las células linfoides que se incubaron en medio RPMI 1640 completo, las que fueron estimuladas con LPS en concentraciones crecientes. Como puede observarse en la Figura 5 el tratamiento “*in vivo*” con el extracto crudo de *Andrographis paniculata*, traducido a la concentración de andrografolido, disminuye la síntesis de ADN “*in vitro*” respecto al grupo control que no recibió el compuesto. El resultado que se muestra acá es el promedio de un total de tres experimentos realizados en diferentes fechas y bajo las mismas condiciones.

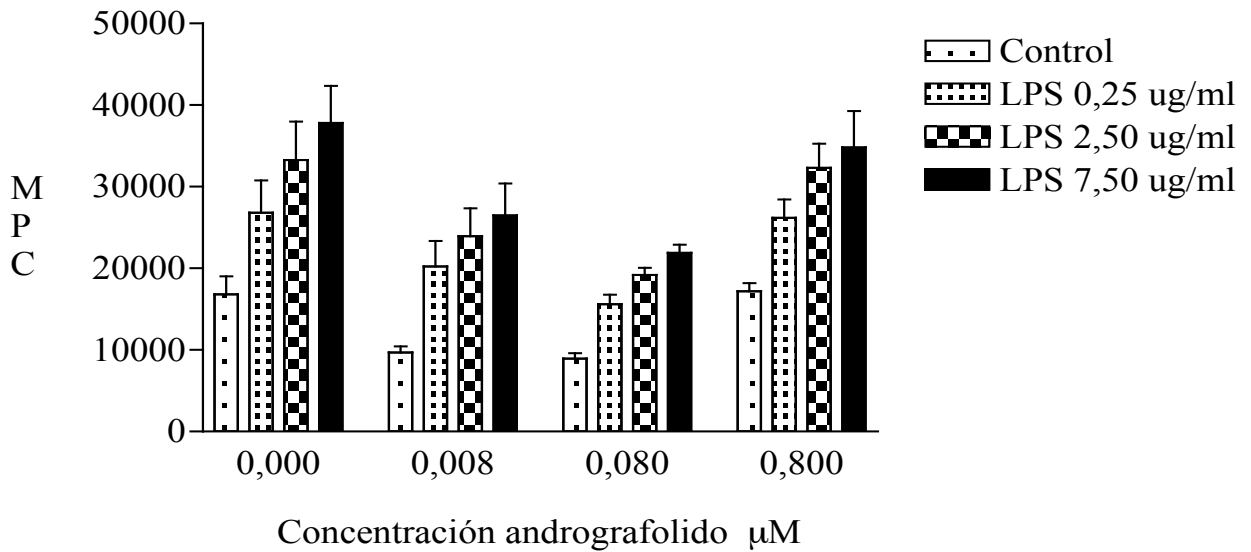


Figura 5: Incorporación de ThyH³ en células esplénicas provenientes de ratones RK tratados “*in vivo*” con diferentes concentraciones del extracto de *Andrographis paniculata*, convertido a las concentraciones de andrografolido, y estimuladas “*in vitro*” con concentraciones crecientes de LPS. Cada una de las barras representa el promedio de los resultados del cultivo realizado por triplicado con su desviación estándar.

4.6.- Promedio del índice de transformación blástica de tres experimentos en los cuales el andrografolido se administró “*in vivo*”.

Luego de obtener los resultados de los tres experimentos similares al mostrado en el punto anterior y realizados en diferentes fechas, se procedió a calcular el índice de transformación blástica de cada experimento y a promediar sus resultados, con el objetivo de demostrar que andrografolido induce “*in vivo*” una disminución de la respuesta blastogénica en forma constante como muestra la Figura 6.

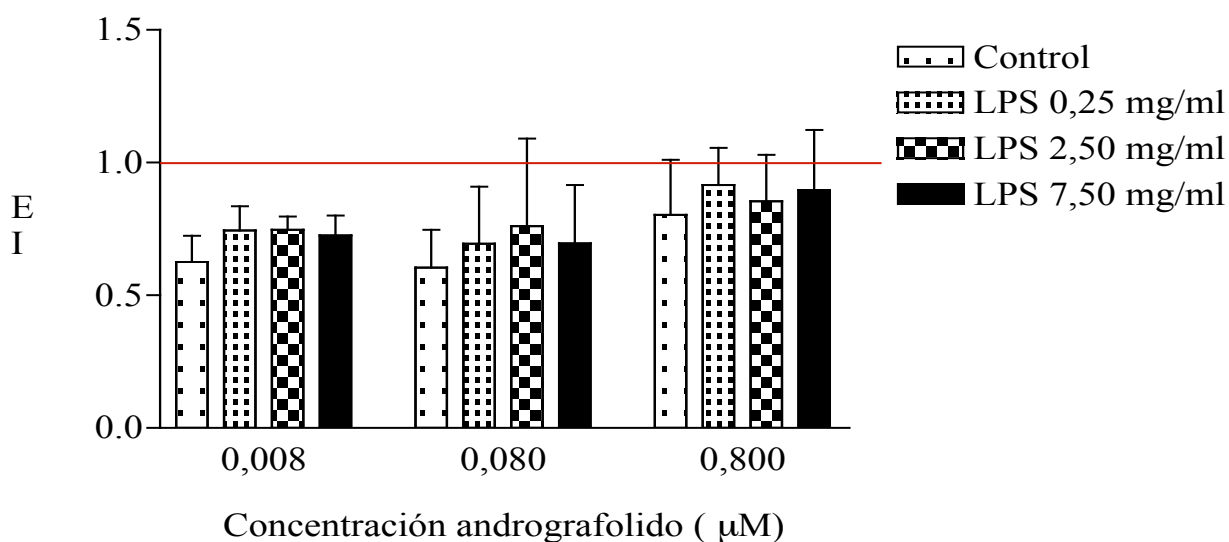


Figura 6: Índice de estimulación de células linfoides de bazo de ratón RK, basado en los resultados del experimento “*in vivo*” con el extracto seco de *Andrographis paniculata*, calculado como la razón de las CPM de los cultivos en presencia de andrografolido dividido por aquellos efectuados en su ausencia. Cada barra representa el promedio de tres experimentos con su respectiva desviación estándar.

4.7.- Efecto de 14-deoxiandrografolido en la respuesta blastogénica de células linfoides, cultivadas en ausencia o presencia de LPS.

Este experimento se realizó con la finalidad de observar el efecto sobre el sistema inmune de otra molécula aislada de *Andrographis paniculata*, 14-deoxiandrografolido (14-DAP). Utilizando de la misma manera que en los experimentos anteriores el método de transformación blástica, los linfocitos obtenidos del bazo de los animales de experimentación se cultivaron por 72 horas con el principio activo en concentraciones de 0,00; 0,05; 0,50 y 5,00 nM y fueron estimuladas o no con LPS en concentraciones crecientes. En la Figura 7 se observa que 14-DAP induce una pequeña disminución de la respuesta de las células B a LPS, que se hace más evidente cuando se aumenta la concentración del mitógeno y con respecto al 14-DAP es dosis dependiente. El resultado del gráfico es el promedio de un total de cuatro experimentos realizados en diferentes fechas y bajo las mismas condiciones.

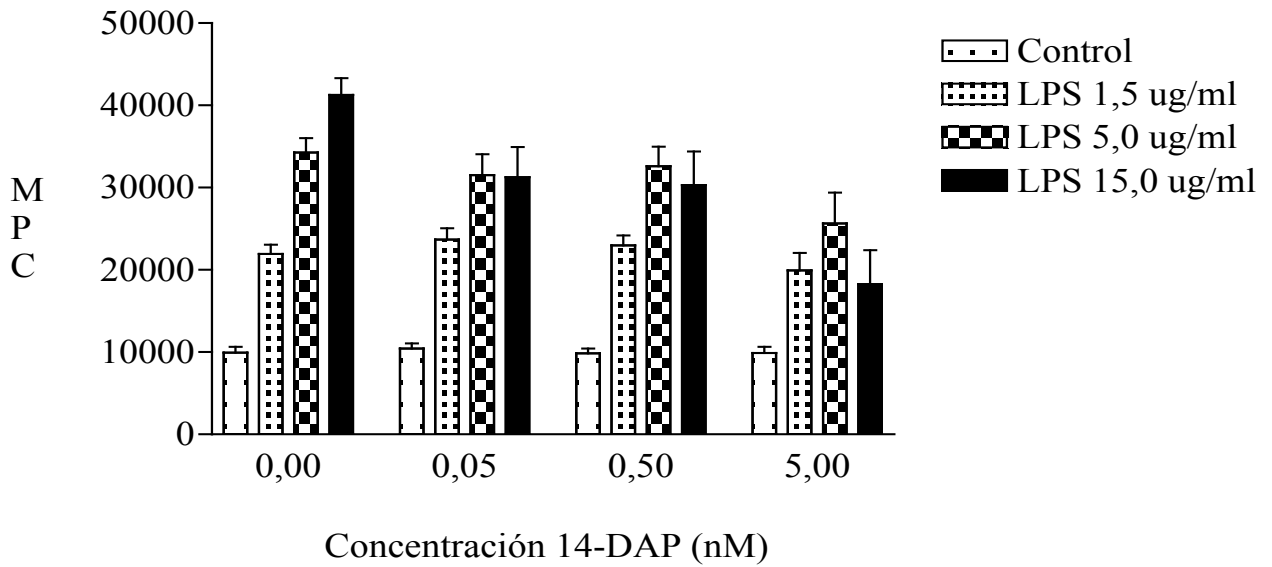


Figura 7: Incorporación de ThyH³ en células esplénicas de ratón RK cultivadas con distintas concentraciones de 14-DAP, estimuladas con LPS en concentraciones crecientes y mantenidas “*in vitro*” por 72 horas. Cada una de las barras representa el resultado promedio de cuatro cultivos cada uno realizado por triplicado con su desviación estándar.

4.8.- Determinación del índice de transformación blástica en cuatro experimentos independientes en que se estudió el efecto de 14-DAP en la síntesis de ADN inducida por LPS.

Al calcular el índice de transformación blástica promedio para los cuatro experimentos “*in vitro*” realizados con 14-DAP el resultado nos muestra que este principio activo induce una disminución de la respuesta a LPS, especialmente a concentraciones elevadas del mitógeno.

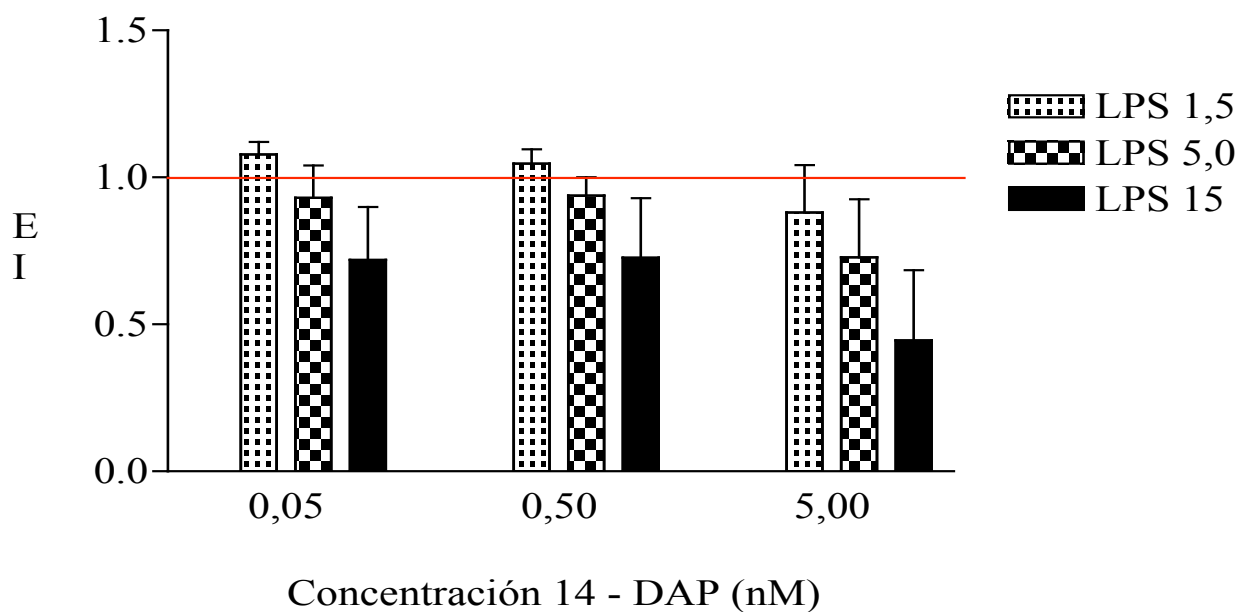


Figura 8: Índice de transformación blástica en células esplénicas de ratón RK, basado en los resultados de los linfocitos tratados “*in vitro*” con 14-DAP y estimulados con LPS en concentraciones crecientes. El índice de estimulación fue calculado como la razón entre las CPM de los cultivos en presencia de 14-DAP dividido por aquellos efectuados en su ausencia. Cada barra representa el promedio de cuatro valores con sus respectivas desviaciones estándares.

5. Discusión y conclusión

5.1- Discusión

En el pasado se ha reportado que *Andrographis paniculata* y andrografolido tienen propiedades estimulantes de la respuesta inmune tanto en animales de experimentación, como en experiencias en la especie humana (Puri *et al*, 1993; Hancke *et al*, 1995; Melchior *et al*, 1996/97; Cáceres *et al*, 1997; Cáceres *et al*, 1999). Este efecto ha sido corroborado en ensayos *in vitro* determinando que este principio activo es capaz de reforzar tanto la respuesta antígeno específica como la no específica (Puri *et al*, 1993). Posteriormente, en estudios clínicos se ha determinado que el extracto de *Andrographis paniculata* ha prevenido el contagio, disminuido los síntomas y acortado el período de duración de un resfrío común en humanos (Hancke *et al*, 1995; Melchior *et al*, 1996 y 1997; Cáceres *et al*, 1999), lo que fue confirmado con una investigación de las propiedades inmunomoduladoras del extracto combinado con andrografolido que determinó que existe una influencia en la inducción de la respuesta inmune tanto celular como humoral (Panossian *et al*, 2002). El presente trabajo ha explorado sólo un aspecto de la respuesta inmune humoral, haciendo experimentos en células esplénicas de ratón con andrografolido y LPS para determinar si existe una actividad demostrable del principio activo en las células B estimuladas con LPS. De acuerdo a los resultados, se ha encontrado que el principio activo administrado “*in vitro*” a células esplénicas induce síntesis de ADN en cultivos no estimulados y no presenta efecto sumatorio ni sinergia en la estimulación de células B incubadas con LPS, por lo tanto la estimulación del principio activo solo observada en los cultivos controles puede deberse a la activación de células T en las que si se ha descrito un efecto estimulador de la producción de

IFN- γ en los trabajos realizados anteriormente en este laboratorio (Folch *et al*, 2004; Martinez, 2003). En estos trabajos se demostró que andrografolido administrado en baja dosis aumenta las citoquinas del tipo TH₁ (IL-2 e IFN- γ) y no modifica la del tipo TH₂ (IL-4) que está relacionada con la activación de las células B.

Por otro lado, en otros estudios realizados en este laboratorio, se probó que andrografolido administrado “*in vivo*” a ratones vacunados con *Brucella abortus* RB-51 aumentaba la respuesta inmune celular, la cual fue medida con la técnica de transformación blástica, pero no fue capaz de aumentar la respuesta inmune humoral (Folch *et al*, 2004; Moraga, 2000). Todo lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, en los cuales no hemos podido demostrar un efecto positivo en la síntesis de ADN de los linfocitos B por andrografolido, más aún estos resultados se complementan con los experimentos en los cuales el extracto de *Andrographis paniculata* se administró “*in vivo*”, generando una disminución de la respuesta “*in vitro*” a LPS, respecto del grupo control. Esto nos hace pensar que para las células B andrografolido no representa un factor positivo o estimulante, que incluso podría tener un efecto inmunosupresor para la producción de anticuerpos. Este efecto no ha sido reportado en otros trabajos.

En el estudio realizado con el 14-DAP se observó una ligera disminución entre los grupos de células tratadas con el principio activo respecto de aquel sin el compuesto, por lo que podríamos decir que el 14-DAP puede tener un efecto negativo sobre la respuesta blastogénica estimulada por LPS, lo que concuerda con un estudio realizado en la universidad que determinó que 14-DAP no aumenta a IL-4, citoquina TH₂ encargada de co-activar a las células B (Seguel, 2004).

5.2- Conclusión

Según los objetivos planteados para este trabajo se concluye lo siguiente:

Andrografolido a la dosis de 0,5 nM aumenta la síntesis de ADN en forma espontánea en cultivos no estimulados por el mitógeno. Este mismo principio activo no causó un efecto en la transformación blástica de linfocitos de ratón inducidos por LPS. En ratones inyectados “*in vivo*” con el extracto de *Andrographis paniculata*, traducido como el efecto de andrografolido, disminuye la transformación blástica inducida por LPS.

El 14-deoxiandrografolido no provocó un efecto en la síntesis de ADN en forma espontánea en cultivos no estimulados por el mitógeno. El efecto de este principio activo en la transformación blástica de linfocitos de ratón inducidos por LPS, provocó una leve disminución a concentraciones superiores.

6. Bibliografía

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. (1998) Inmunología celular y molecular. 3ª. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, España.
2. Bermejo A. y Duarte J. (2003) Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. *Ars. Pharmaceutica*, 44, 121-139.
3. Cáceres, D. D., Hancke, J. L., Burgos, R. A. and Wikman, G. K. (1999) Use of visual analogue scale measurements (VAS) to asses the effectiveness of standardized *Andrographis paniculata* extract SHA – 10 in reducing the symptoms of common cold. A randomized double blind – placebo study. *Phytomedicine*, 6, 217 – 223.
4. Cáceres, D. D., Hancke, J. L., Burgos, R. A. and Wikman, G. K. (1997) Prevention of common cold with *Andrographis paniculata* dried extract. A Pilot double blind trial. *Phytomedicine*, 4, 101 – 104.
5. Ferrer, R. (1994) Inmunidad y Alergia. En: Córdova, A., Ferrer, R., Muñoz, M. E., Villaverde, C. Compendio de Fisiología para ciencias de la salud: 245 – 257. Mc Graw-Hill Interamericana, España.
6. Fletcher, M. A., Urban, R. G., Asthana, D., Walling, J., Friedlander, A., Page, J. B. (1997) Lymphocyte Proliferation. In: Rose, N. R., Conway De Macario, E., Folds, J. D., Lane, H. C., Nakamura, R. M. (5ª Ed.) Manual of Clinical Laboratory Immunology: 313 – 319. American Society for Microbiology, Washington.
7. Folch, H., Oñate, A., Barría, M., Burgos, R., Hancke, J., Ortega, M. (2004) Immunomodulatory effect of andrographolide: selective potentiation of Th-1 response against *Brucella abortus* in mice. *Inmunology 2004*. MEDIMOND Italia, 353 - 357.

8. Diasio, R. B. y LoBuglio, A. F. (1996) Inmunomoduladores: fármacos inmunosupresores e inmunoestimulantes. En: Goodman, A., Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P., Ruddon, R. (9ª Ed.) Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica: 1371 – 1387. McGraw-Hill Interamericana Editores, México.
9. Gupta, S., Choudhry, M. A. and Yadava, J. N. S. (1990) Antidiarrhoeal activity of diterpenes of *Andrographis paniculata* (Kal-Megh) against *Escherichia coli* enterotoxin in vivo models. *Int. J. Crude Drug Res.*, 28, 273 - 283.
10. Hancke, J., Burgos, R., Caceres, D., Wikman, G. (1995) A double – blind study with a new monodrug Kang Jang: decrease of symptoms and improvement in the recovery from common colds. *Phytother. Res.*, 9, 559 – 562.
11. Jantan I., Waterman, P. G. (1994) Ent - 14₁ – hydroxyl – 8(17), 12 – labdadien – 16, 15 – olide - 3₁, 19 – oxide: A diterpene from the aerial parts of *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*. 37, 1477 – 1479.
12. Kapil, A., Koul, I. B., Banerjee, S. K., Gupta, B. D. (1993) Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata*. *Biochem. Pharmacol.*, 46, 182 - 185.
13. Martinez, V. (2003) Determinación del efecto del principio activo HB 001 de *Andrographis paniculata* en el sistema inmune. Tesis, Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 45 pp.
14. Melchior, J., Palm, S. and Wikman, G. (1996/97) Controlled clinical study of standardized *Andrographis paniculata* extract in common cold – a pilot trial. *Phytomedicine*, 3, 315 – 318.

15. Montes, M., Valenzuela, L., Wilkomirsky, T. (1992) Plantas medicinales. Ediciones Universidad de Concepción, Chile. 207 pp.
16. Moraga, Y. A. (2000) Efecto de *Andrographis paniculata* y algunos de sus principios activos en el sistema inmune. Tesis, Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile, 42 pp.
17. Panossian, A., Davtyan, T., Gukassyan, N., Gukasova, G., Mamikonyan, G., Gabrielyan, E. and Wikman, G. (2002) Effect of andrographolide and Kang Jang – fixed combination of extract SHA-10 and extract SHE-3 – on proliferation of human lymphocytes, production of cytokines and immune activation markers in the whole blood cells culture. *Phytomedicine*, 9, 598 – 605.
18. Perez, M. (2005) Evaluación del efecto inmunosupresor de andrografolido en la producción de citoquinas de las células de ratón. Tesis, Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 41 pp.
19. Puri, A., Saxena, R., Saxena, R. P., Saxena, K.C., Srivastava, V., Tandon, J. S. (1993) Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. of Natural products*, 56, 995 - 999
20. Roitt, I., Brostoff, J. y Mele, D. (1997). Inmunología (4ª Ed.) Harcourt Brace, España.
21. Seguel, K. P. (2004) Determinación en ratones, del efecto inmunosupresor del principio activo 14 – deoxiandrografolido (14-DAP), de *Andrographis paniculata*. Tesis, Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 40 pp.
22. Sharma, A., Singh, R. T., Sehgal, V. and Handa, S. S. (1991) *Andrographis paniculata*, *Eclipta alba*, *Plumbago zeilanica* and *Thephroisa purpurea*, the most frequently used Indian plants in antihepatotoxic herbal formulations. *Fitoterapia* 62, 131 – 138

23. Singh, M., Pal, M. and Sharma, R. P. (1998) Biological activity of the labdane diterpenes. *Planta Med.*, 65, 2 – 8
24. Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992). *Andrographis paniculata* (Burn. F.) Nees. In: Chinese drugs of plant origin, chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine, Springer Verlag Berlin, 97 - 103
25. Thamlikitkul, V., Dechatiwongse, T., Theerapong, S., Chantrakul, C., Boonroj, P., Punkrut, W., Ekpalakorn, W., Boontaeng, N., Taechaiya, S., Petcharoen, S., *et al.* (1991) Efficacy of *Andrographis paniculata*, Nees for pharyngotonsillitis in adults. *J. Med. Assoc. Thai.* 74 (10), 437 - 42.
26. Tripathi, G. S. and Tripathi, Y. B. (1991) Choleric action of andrographolide obtained from *Andrographis paniculata* in rats. *Phytother. Res.*, 5, 176 – 178.
27. Vergara, U. (1998) Regulación de la respuesta inmune. En Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Rosseblatt, M., Vergara, U. Fundamentos de inmunología: 287 – 304. Editorial Universidad de Talca, Chile.
28. Zhang, C. Y. and Tan, B. K. H. (1998) Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by 14-deoxyandrographolide. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 25, 424 – 429
29. Zhang, C. Y., Kuroyangi, M., Tan, B. K. H. (1998) Cardiovascular activity of 14-Deoxy-11, 12-didehydroandrographolide in the anesthetized rat and insolated right atria. *The Italian Pharmacol. Society*, 1, 1 – 5.