



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Miguel Barría Maldonado.
INSTITUTO: Inmunología
FACULTAD: Medicina

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Hugo Folch Vilches.
INSTITUTO: Inmunología
FACULTAD: Medicina

“Evaluación de la respuesta inmunológica utilizando distintos preparados fitoterapéuticos en animales de experimentación”.

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

JORGE IVAN VALLEJOS VALLEJOS

VALDIVIA-CHILE

2006

**Con inmenso amor, cariño y gratitud, a
mis padres Carlos y Elizabeth, a mi
esposa Mabel, mis hijos Jorge, Felipe y
Sebastián.
Gracias.**

AGRADECIMIENTOS.

En estos momentos como el pasado, agradezco con todo el corazón de hijo a Dios, y a las más grandes personas que siempre han formado parte de mi vida, a quienes sin descanso impulsaron en todo momento, el seguir siempre adelante y con la mirada al frente, quienes han creído en mis ideas y las han compartido, sin ellos no habría sido posible llegar hasta aquí.

A mis hermosos Padres Carlos (Papá) que aunque no estés presente y a Elizabeto (Mamá). Gracias por quererme siempre y por acompañarme y aconsejarme en toda esta vida.

A mis grandes amigos de estos últimos años. Pepe, colega y amigo de siempre, a Javier y Juan Pablo. Gracias por soportarme amigos.

A mi esposa e hijos, siempre fieles y queridos, no me queda más que mi eterno agradecimiento cariño y amor, por hacer de todos los días algo realmente distinto.

A mis hermanos, todos ellos.

A la abuelita Geno y mis suegros.

A todo el personal y amigos del Instituto de Inmunología, a quienes compartieron el trabajo de esta Tesis. Infinitas Gracias

Finalmente, agradecer al Dr. Hugo Folch y el Dr. Miguel Barría. Maestros quienes me han soportado y ayudado siempre durante gran parte de mi carrera profesional. Por su constante apoyo, dedicación y paciencia. Infinitas gracias.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
1. SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIAL Y MÉTODO	
2.1 Animales de experimentación.	
2.1 Extractos naturales.	8
2.1.3 Extracto total de GJ-001.	8
2.3 Antígenos.	
2.3.1 Gamma globulina Humana.	8
2.3.2 <i>Brucella abortus</i> RB-51.	9
2.3.3 Inducción de Tiroiditis Autoinmune (TAE)	9
2.3.3.1 Obtención de tiroglobulina.	9
2.4 Obtención de sueros de animales inmunizados .	10
2.5 Obtención de tiroides.	10
2.6 Determinación de niveles de anticuerpos.	10
2.7 Obtención de los órganos linfoides y cultivo de éstos para estudio de respuesta inmune.	11
2.8 Ensayo de proliferación de linfocitos “ <i>in vitro</i> ”.	12
2.9 Cultivo de macrófagos J774.2.	12
2.10 Ingestión de rojo neutro por los macrófagos J774.2.	12
2.11 Fagocitosis de microesferas fluorescentes por macrófagos J774.2.	13
2.12 Inmunocitoquímica Southwestern.	13

3. RESULTADOS.

3.1 Respuesta inmune humoral.	15
3.1.1 Determinación de anticuerpos anti inmunoglobulina humana y anti- <i>Brucella</i> en animales de experimentación tratados y no tratados con GJ-001.	15
3.1.2 Determinación de efecto adyuvante de la respuesta inmune humoral anti-IgG h del extracto de GJ-001 inyectado por vía intraperitoneal junto con el antígeno o en forma separada por vía subcutánea.	17
3.1.3 Determinación de IgG total y sub clases de anticuerpos específicos en animales de experimentación tratados con diferentes concentraciones de GJ-001.	18
3.1.4 Cinética de producción de IgG total y sub clases de anticuerpos específicos anti IgG h en animales de experimentación tratados con GJ-001.	19
3.1.5 Efecto del extracto GJ-001 en la respuesta inmunológica primaria y secundaria.	21
3.2 Respuesta inmune celular.	22
3.2.1 Respuesta blastogénica en ratones inmunizados con <i>Brucella</i> sola o acompañada de GJ-001.	22
3.3 Inmunidad Innata.	23
3.3.1 Incorporación de microesferas fluorescentes por macrófagos J774.2 y activados con GJ-001.	23
3.3.2 Aumento de la incorporación de Rojo neutro en macrófagos J774.2 activados con GJ-001.	25

3.3.3 Efecto del tiempo de presencia de GJ-001 en cultivo con células J774.2, en su capacidad fagocítica.	26
3.3.4 Grado de activación de NF-k β aplicando Inmunocitoquímica Southwestern, en macrófagos J774.2 incubadas con GJ-001.	27
3.4 Respuesta Autoinmune.	28
3.4.1 Determinación de anticuerpos anti-Tiroglobulina en animales de experimentación, tratados con <i>E. purpúrea</i> , Andrografolido y GJ-001 como inmunomoduladores.	28
4. DISCUSIÓN	30
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBIOGRAFÍA	33
7. ANEXO	36

RESUMEN

El uso de las plantas representa un aspecto importante en la historia de la medicina debido a su significativa contribución al desarrollo de la farmacoterapia moderna. Dentro de las plantas que han sido utilizadas como preparados fitoterapéuticos y comercializadas tenemos aquellas usadas para el tratamiento de diversas enfermedades, donde el sistema inmunológico juega un importante papel .

Conociendo la importancia de la utilización fitoterapéutica y su aplicación como estimulantes del sistema inmunológico, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto del extracto total de GJ-001, preparado de una planta autóctona, en la respuesta inmune celular y humoral, adicionalmente se ha investigado "*in vitro*" su capacidad para estimular células macrofágicas cuya importancia en la defensa del individuo no puede ignorarse.

En este estudio, se llevaron a cabo diversos ensayos experimentales en ratones, con la finalidad de demostrar si estos preparados fitoterapéuticos presentan alguna actividad inmuno-moduladora. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos en animales experimentales, permiten concluir que: A) La respuesta inmune humoral aumenta de manera importante al utilizar el extracto total de GJ-001, afectando este aumento a los isotipos IgG1 e IgG2a. B) La respuesta inmune celular se ve disminuida de acuerdo a los resultados obtenidos con los ensayos de linfoproliferación. C) No se evidencia un aumento en la respuesta celular o humoral en animales con tiroiditis experimental auto-inmune, siendo esto último importante, debido a que la utilización de este preparado no afectaría el curso de esta enfermedad ni contribuiría a inducirla. D) Al estudiar el efecto de este extracto sobre células macrofágicas se observa un importante aumento de su actividad lo que indicaría una estimulación de la inmunidad de tipo innata, observándose también, en forma correlativa una importante activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B.

1. SUMMARY

The use of the plants represents an important aspect in the history of the medicine due to the significant contribution to the development of the modern pharmacotherapy. Within the plants that has been used as phytotherapeutic agents and commercialized, are those used for the treatment of different diseases, in which the immunological system plays an important role.

Knowing the importance of the medicinal plants in the phytotherapy and its application as immunostimulants, in the present work, of the total extract of GJ-001, prepared from a native plant was studied. Therefore the effect of GJ-001 in the cellular and humoral immune response, as well in the macrophage function was evaluated.

In this study, diverse experimental trials in mice were carried out, with the purpose of demonstrate the immunomodulatory activity the this extract.

The results obtained in the different trials in experimental animals, allow to conclude that: The humoral immune response increases when the total GJ-001 extract is used, this increase affects the immunoglobulin isotypes IgG1 and IgG2a. in contrast the cellular immune response is diminished according to the results obtained in the lymphoproliferation assays. There is no evidenced of changes in the cellular and humoral immune response in animals with experimental autoimmune thyroiditis is results of the use of the extract under study which is important, since we can conclude that the use of this extract will not affect the course of this disease nor would contribute to induce it. On the other hand, when studying the effect of this plant extract on macrophage cells is observed an important increase of its activity which way indicate an stimulation of the innate immunity, correlated with an important activation of the nuclear transcription NF- κ B factor.

1. INTRODUCCION.

El uso de las plantas representa un aspecto importante en la historia de la medicina debido a su significativa contribución al desarrollo de la farmacoterapia moderna. Debemos al reino vegetal algunas de las drogas más activas con que contamos, como la *digital*, la *quinina*, la *ipecuana*, la *coca* el *opio* y numerosas otras. La naturaleza continúa siendo una fuente potencial de drogas, así se estima que de las 250.000 a 500.000 especies de plantas superiores que existen clasificadas, sólo el 5-10% ha sido investigado en relación a su composición química o actividad biológica. Paralelamente, continúan empleándose miles de especies vegetales que vienen siendo utilizadas desde centurias por la medicina popular, cuyo conocimiento empírico ha sido transmitido de una generación a otra de manera oral o escrita. Entre 1930 y 1960 hubo avances importantes en la botánica médica debido al descubrimiento de numerosas drogas de sorprendente eficacia, comenzando por los alcaloides relajadores de músculos que derivan del veneno usado en flechas por habitantes del Amazonas (curare), el descubrimiento de la penicilina y muchos otros antibióticos de musgos, bacterias, líquenes y otras plantas. (Sharapin., 2000)

Las plantas medicinales representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados, lo que contrasta con lo que ocurre en los países en desarrollo en que el uso de plantas medicinales representa el 80% del arsenal terapéutico. Por otro lado, aquellas utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras, representan un área en franca expansión. Estas sustancias naturales puras y los extractos purificados o estandarizados adquieren una importancia cada vez mayor, pues permiten una mejor caracterización analítica, lo que hace posible que se cumplan de manera eficaz los requisitos de calidad, efectividad y seguridad, exigidos a cualquier medicamento sea este de origen natural o sintético. (Sharapin., 2000)

Entre las razones que justifican el interés creciente por las plantas medicinales, en los países industrializados, se pueden mencionar, la falta de

nuevos descubrimientos por los procesos tradicionales de síntesis química, de moléculas farmacológicamente activas y de posible uso terapéutico, los efectos secundarios de algunos fármacos sintéticos y el cambio de perfil del consumidor que prefieren cada vez más productos de origen natural, no solo en el ámbito farmacológico sino también en, alimentación, vestuario e higiene. (Sharapin., 2000)

En los países en desarrollo, que corresponde al 75% de la población mundial se consume menos del 15% del mercado total de medicamentos. Una gran parte de esta población no tiene acceso a los medicamentos industrializados, constituyendo por esta razón, el uso de las plantas medicinales el principal recurso terapéutico disponible, especialmente en la población de menores ingresos económicos. (Gurley et al. 2004).

Dentro de las plantas que han sido utilizadas como preparados fitoterapéuticos con propiedades inmuno-modulatorias y sobre las cuales se han realizado diversos estudios tendientes a conocer su composición química y los efectos farmacológicos que de ellos derivan, podemos señalar a *Andrographis paniculada* y las especies de *Echinacea* con reconocido efecto inmuno-estimulador, adicionalmente la medicina natural local ha reportado casos en que cuadros infecciosos han sido tratados con éxito con hojas de un árbol el cual se encuentra entre la 8ª y 12ª región de nuestro país y cuyo extracto total que hemos denominado GJ-001, será el punto central del presente estudio.

Para explorar la capacidad de un determinado compuesto químico o extracto total de una determinada planta, con potencial capacidad moduladora de la respuesta inmune, debemos conocer como funciona el sistema inmunológico, al respecto hoy podemos decir que , la respuesta inmune específica generada ante cualquier antígeno puede ser de tipo celular o humoral (Roitt et al., 1997), ambas dependen de los linfocitos que tienen su origen en células hematopoyéticas totipotenciales (células madres) ubicadas en la médula ósea, la progenie de estas células posteriormente se diferencian en pre-linfocitos y estos en linfocitos T o B responsables de la respuesta inmune celular y humoral, respectivamente. Adicionalmente a esta función efectora, los linfocitos T cumplen una importante

función reguladora tanto para la respuesta inmune humoral como celular. De acuerdo a esto, los linfocitos T se pueden clasificar en linfocitos Th1, llamados también células T helper inflamatorias, que son los encargados de activar la respuesta inmune celular (Flesh y Kaufmann, 1989) y los linfocitos Th2, los cuales son efectivos en la estimulación del crecimiento y diferenciación de los linfocitos B y por ende, encargados de modular en forma positiva la respuesta inmune humoral (Abbas, 1988). Las células Th1 secretan principalmente IFN- γ , IL-2 y TNF y las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13.(Flesh y Kaufmann, 1989).

La magnitud de la respuesta frente a un determinado estímulo antigénico esta condicionada por varios factores, unos dependen del antígeno y otros del huésped. En este último grupo adquiere especial relevancia la regulación inmune celular a cargo de las células Th1 y Th2 (Mossman et al., 1986). Estas poblaciones de linfocitos secretan linfoquinas que activan a un tipo particular de respuesta, (la Th1 activa la respuesta inmune celular y la Th2 la respuesta inmune humoral), enviando señales positivas, a cada una de estas ramas de la respuesta inmune y por otro lado antagonizando a la población helper contraria. De esta manera, generalmente la respuesta inmune resultante es predominantemente celular o predominantemente humoral, que es lo que hoy conocemos como "polarización de la respuesta inmune". Al respecto se sabe que frente a infecciones por microorganismos intracelulares (virus y algunas bacterias) la respuesta inmune celular comandada por células Th1, es fundamental, y por el contrario frente a infecciones causadas por bacterias y parásitos extracelulares, la respuesta inmune humoral activada por lo linfocitos Th-2 es fundamental.

Por otro lado sabemos que la respuesta inmune también, puede tener consecuencias negativas que se hacen especialmente evidentes en los casos de autoinmunidad, cuadros en los que este sistema tan importante en la defensa del organismo causa directamente daño a componentes del propio organismo. El

desarrollo de las enfermedades autoinmunes se encuentran fuertemente condicionadas por la acción de citoquinas, en especial el balance producto de las células Th1/Th2. Es el caso de la tiroiditis autoinmune experimental (TAE), la cual es un modelo experimental de tiroiditis de Hashimoto. Esta es una enfermedad

autoinmune órgano específica mediada por células T, se caracteriza por presentar una infiltración linfocitaria en la glándula tiroidea, además de la producción de autoanticuerpos anti-tiroglobulina. La TAE puede ser inducida en ratones genéticamente susceptibles, por medio de la inyección de tiroglobulina (Tg) en dosis repetidas o en combinación con coadyuvantes como lipopolisacarido (LPS) o coadyuvante completo de Freund (CCF) (Esquivel et al., 1977), la TAE puede ser transferida por la inyección de células T provenientes de animales que están desarrollando la enfermedad, esto demuestra el rol fundamental de los linfocitos T en su inducción (Braley-Mullen, et al., 1985). Las citoquinas que se producen durante las diferentes etapas de la respuesta autoinmune pueden ejercer actividades inmuno-estimuladoras o inmuno-supresoras. La decisión sobre cual efecto predomine, probablemente dependerá de la regulación en el tiempo, ubicación y cantidad de ésta secreción, además del tiempo de exposición (Barin, et al., 2003; Yu, et al., 2002; Wang, et al., 2002). En cuanto a los procesos moleculares que interactúan y a los genes que codifican factores para moléculas coestimuladoras se puede afirmar que éstos genes son regulados por varios grupos de factores de transcripción, entre ellos; NF- κ B, NF-IL-6 y NF-AT (Akira et al., 1997). El factores de trascrición NF- κ B (Nuclear factor kappa B) es una proteína dimérica, que en un principio fue identificado como un regulador de la expresión de los genes de la cadena liviana kappa en linfocitos B murinos, y hoy se sabe que regula la expresión de citoquinas, proteínas quimiotácticas, moléculas de adhesión y proteínas de matriz comprometidas en mecanismos inflamatorios, respuesta inmunológica, diferenciación celular y control de crecimiento (Akira et al., 1997; Barnes et al., 1997). Este factor de transcripción NF- κ B se encuentra en forma inactiva en la mayoría de las células formando un heterodímero de las subunidades p65 y p50, aunque también puede estar formado por otras proteínas como, rel, relB, y p52. Este factor de transcripción puede encontrarse en el citoplasma de las células formando un complejo inactivo con la proteína I κ B. La estimulación celular, conduce a la fosforilación y degradación de I κ B; subsecuentemente el heterodímero NF- κ B es traslocado al núcleo celular donde se une a secuencias específicas de las regiones promotoras de ciertos genes con

lo cual se activa posteriormente la transcripción (Akira, et al, 1997). Un efecto importante de la activación de NF- κ B es la rápida “up regulation” de genes en respuesta a la estimulación, sin el retardo requerido para la síntesis de proteínas. Con respecto a esto se ha demostrado la importancia de la activación de NF- κ B en el desarrollo de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) y su rol en la patogénesis de esta enfermedad.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y sabiendo la importancia de la utilización fitoterapéutica de plantas de uso medicinal y su aplicación como estimulantes del sistema inmunológico, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto del extracto total de GJ-001, preparado de una planta autóctona, en la respuesta inmune celular y humoral y adicionalmente se ha investigado “*in vitro*” su capacidad para estimular células macrofágicas cuya importancia en la defensa del individuo no puede ignorarse.

2. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 Animales de experimentación.

En todos los experimentos que se muestran se utilizaron ratones hembras de la cepa Rockefeller (RK) con edades aproximadas entre 4 y 6 semanas, los cuáles fueron mantenidos a una temperatura regulada de 22° C en cajas que contenían cada una 8 ejemplares, con agua “*ad libitum*” y alimento a libre disposición, mantenidos en el vivero del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

2.2 Extractos naturales.

2.2.1 Extracto total de GJ-001.

Se utilizó para los ensayos experimentales una extracción total acuosa obtenida de las hojas de la planta autóctona en estudio, este extracto acuoso fue preparado en el Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

2.3 Antígenos.

En los diferentes ensayos experimentales, se utilizarón como antígeno, IgG humana , la cepa vaccinal de **Brucella abortus** RB-51 y tiroglobulina de ratón

2.3.1 Gamma globulina Humana.

Se utilizó para estos ensayos experimentales una preparación comercial de gamma globulina humana (Institut Merieux, Lyon , France), la cual se administró por vía intraperitoneal en ratones, en dosis de 50 ug por animal en un volumen de 200 ul . Este antígeno fue administrado disuelto en PBS, GJ-001 o diluciones de este último. En una serie experimental, la IgG humana se inyectó disuelta en PBS por vía intraperitoneal, mientras GJ-001 se inyectó separadamente por vía subcutánea.

2.3.2 *Brucella abortus* RB-51.

Brucella abortus RB-51, fue obtenida de un preparado comercial de (Vaccine strain RB-51 live culture), (Professional Biological company. USA). Fue administrada por vía intraperitoneal en 200 μ l de PBS o GJ-001, usando para esto 10^8 CFU por animal de experimentación.

2.3.3 Inducción de Tiroiditis Autoinmune (TAE).

En los experimentos de inducción de TAE, se usó tiroglobulina singeneica, cada ratón recibió al día cero 100 μ g de tiroglobulina vía intraperitoneal (500 μ g/ml) acompañado por LPS 3 horas más tarde, para repetir esta inmunización al día 7 con las mismas dosis antes descritas. Como control negativo de estos ensayos experimentales se inyectó tiroglobulina sola.

2.3.3.1 Obtención de la Tiroglubulina.

La Tiroglobulina (Tg) se obtuvo en el laboratorio, para lo cual se extirparon glándulas tiroideas de ratones Rockefeller normales sacrificados por sobredosis de éter etílico. Las tiroides fueron sometidas a homogeneización, centrifugadas a 9.000g a 4° C por 20 minutos. El sobrenadante así obtenido se precipitó con 33% de una solución saturada de sulfato de amonio pH 8.0 (Sigma Chemical Co, USA), y se centrifugó a 9.000g a 4° C por 10 minutos. Posteriormente se precipitó nuevamente con sulfato de amonio saturado al 45% (rango de precipitación de la tiroglobulina) con agitación por 10 minutos, para luego volver a centrifugar a 9.000g a 4° C por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y el sedimento que contiene la tiroglobulina fue resuspendido en 1 ml de agua destilada, y dializado dos veces en suero fisiológico durante 24 horas a 4° C en agitación constante.

La concentración de Tg fue determinada mediante espectrofotometría a 280 nm y finalmente almacenada a -20° C hasta su uso. La pureza de la tiroglobulina se verificó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes.

2.4 Obtención de sueros de los animales de experimentación .

Estos fueron obtenidos desde las venas caudales, para esto se procedió a incubar la sangre a 37° C con el fin de apurar la retracción del coagulo y de ésta forma extraer el suero, que luego fue centrifugado a 500 g por 5 minutos a 20° C (Centrifugue Micro 22.R. Germany) y guardado a -20° C hasta su utilización.

2.5 Obtención de Tiroides.

Para la obtención de las tiroides, los animales de los distintos grupos experimentales fueron sacrificados por inhalación excesiva de éter etílico (Equilab. Santiago, Chile). Luego se extrajo la tiroides en crioviales y se almacena en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizaron los cortes a congelación para ser utilizados en tinción con Hematoxilina – Eosina e Inmuno-citoquímica Southwestern.

2.6 Determinación de niveles de anticuerpos.

Esta determinación se llevó a cabo mediante un ensayo de ELISA con los sueros recolectados de los diferentes grupos de ensayos experimentales realizados, en los diferentes tiempos de sangrado.

El ensayo se inició con la unión del antígeno a la placa, ya sea tiroglobulina (Tg) 10 ug/ml , Inmunoglobulina G humana 50 ug/ml o *Brucella abortus* RB-51 10⁸ cel/ml, el cual se fijo a la placa de 96 pocillos, (Pierce Chemical Co.), en 100 ul de buffer carbonato bicarbonato 0.05 M a pH 9.6, incubándose la placa toda la noche a 4° C. Terminada la incubación del antígeno se procedió a eliminar el sobrenadante, posteriormente se bloqueó la placa con 100 µl de leche descremada al 5 % en buffer fosfato salino pH 7,2 (PBS), y se incubó 1 hora a 37° C, seguido a esto se adicionó a cada pocillo de la placa 100 µl de los diferentes sueros de ratón y se incubó 1 hora a 37° C. Terminado éste período se realizaron tres lavados de la placa con PBS-Tween 20 al 0.05 %. El paso siguiente fue agregar 100 µl de anticuerpo anti – IgG de ratón conjugado a peroxidasa, anti-IgG₁- conjugado a peroxidasa o anti-IgG 2^a conjugado a peroxidasa (Pierce Chemical Co, USA) diluidas en PBS y albúmina al 0.05%, la placa se incubó a

37° C durante 1 hora. Se repitió el lavado anteriormente descrito para luego agregar el sustrato ortofenilendiamina (Sigma Chemical Co. USA) (OPD), 4 mg/ml en buffer fosfato citrato pH 5.0 más 18 µl de H₂ O₂ 10 volúmenes. Pasados 15 minutos, se detuvo la reacción adicionando 50 ul a cada pocillo de ácido sulfúrico 2.5 M (Sigma Chemical Co. USA). La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 490 nm en un lector automático de ELISA (EL_x 800, Universal microplate reader, Bio-tek Instruments).

2.7 Obtención de los órganos linfoides y cultivo de estos para estudio de respuesta inmune.

Para la obtención de los órganos linfoides, los animales de los distintos grupos experimentales, fueron sacrificados por inhalación excesiva de éter etílico (Equilab. Santiago, Chile). Posteriormente se extrajo el bazo el cual fue mantenido en una placa Petri en medio RPMI 1640 completo y a refrigeración, bajo condiciones de esterilidad. Las células linfoides se obtuvieron disgregando estos órganos en medio de cultivo RPMI 1640 completo estéril, y los linfocitos obtenidos fueron lavados y resuspendidos en 1 ml de medio RPMI 1640 completo y cuantificados en cámara de Neubauer.

2.8 Ensayo de proliferación de linfocitos “*in vitro*”.

Para el ensayo de linfoproliferación, los linfocitos fueron ajustados a una concentración de 4 x 10⁶ células en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone, USA), penicilina, estreptomicina (Sigma Chemical Co, USA), piruvato de sodio (Sigma Chemical Co, USA) mercaptoetanol (Sigma Chemical Co, USA) y anfotericina B (Sigma Chemical Co, USA). Posteriormente se tomaron alícuotas de 100 ul de la suspensión celular las cuales fueron distribuidas en placas estériles de 96 pocillos (Nunclon, Denmark), y se adicionó 100 ul de medio de cultivo con diferentes concentraciones de **Brucella abortus** RB-51 y sin estimulante como control negativo. El cultivo celular se mantuvo por 48 horas en atmósfera húmeda a 37° C con 5% de CO₂.

Posteriormente, las células de cada pocillo fueron pulsadas con 0,5 uCi de timidina tritiada (H^3 Thy) (Amersham , Biosciences) y cosechadas 24 horas después según las condiciones del experimento. El cosechador de células deposita automáticamente el producto de los cultivos sobre filtros de fibra de vidrio, los cuales se dejaron secar a 37° C por 20 minutos y la radioactividad incorporada al DNA fue medida en cada uno de los filtros en un contador de centelleo, la incorporación de timidina tritiada fue expresada en cuentas por minuto (cpm),

2.9 Cultivo de macrófagos J774.2

Durante los distintos ensayos experimentales se utilizó la línea celular de macrófagos J774.2 (ATCC, USA), que corresponde a macrófagos murinos obtenidos de células de sarcoma reticular. Dentro de las características que presentan, esta su activa fagocitosis dependiente de anticuerpos, sintetizan grandes cantidades de lisozima e IL-1 y su crecimiento es inhibido por sulfato de dextran o LPS. Los macrófagos fueron cultivados en 10 ml de medio RPMI-1640 completo (Sigma Chemical Co., USA) utilizando botellas de cultivo celular estériles de 25 cm² (Corning Costar Co., USA), incubadas a 37° C de temperatura en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂ y una humedad de 96%, para tal efecto se utilizó un incubador de cultivos celulares (Heraeus D-6450, Hanau, Denmark). Todo el proceso de cultivo fue realizado bajo asepsia rigurosa , para lo cual se utilizó una cámara de flujo laminar (Nuair UN-201-630, Plymouth, USA).

2.10 Ingestión de rojo neutro por macrófagos J774.2

El rojo neutro es un 3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina hidrocloreto (Merck, Darmstadt, Germany), que se utiliza comúnmente como indicador y colorante biológico. Los macrófagos son capaces de fagocitar los microcristales formados por este colorante los cuales se acumulan en los lisosomas de las células viables no dañadas. Además, el rojo neutro absorbe la luz de manera óptima a una longitud de onda de 540 nm y sus cualidades fotocolorimétricas no

varían por efecto de la luz, oscuridad y temperatura (37° C), manteniéndose estable a través del tiempo.

Con la finalidad de inducir la incorporación de rojo neutro de las células macrofágicas en estudio, se dispuso 5x10⁴ células macrofágicas J774.2 en placas de cultivo celular estériles de 24 pocillos (Corning Costar Co., USA), las cuales fueron estimuladas a distintos tiempos y distintas concentraciones, con el extracto total de la planta GJ-001, para posteriormente adicionar una solución de rojo neutro a una concentración de 36 mg/ dl, e incubarlas a 37° C, 5% de CO₂ y 96% de humedad.

2.11 Fagocitosis de microesferas fluorescentes por macrófagos J774.2.

En este experimento se utilizaron micro esferas fluorescentes de látex (Polysciences, USA.) de 1 um de diámetro. La cantidad de micro esferas a utilizar fue ajustada en 6 x 10⁸ / ml en PBS , de esta suspensión se adicionó 40 ul a los pocillos de cultivo (Corning Costar Co., USA), los cuales contenían 1 x 10⁶ de macrófagos de la línea J774.2, resuspendido en 1 ml de medio RPMI-1640 completo. Las placas fueron incubadas a distintos tiempos y distintas concentraciones con el extracto total del GJ-001, e incubadas a 37° C de temperatura y bajo una atmósfera suplementada con 5% de CO₂ y 96% de humedad. Terminado el tiempo de incubación se tomo una alícuota de la suspensión celular y se depositó en una cámara de Neubauer para la evaluación de la fagocitosis de las esferas, usando un microscopio de fluorescencia.

2.12 Inmunocitoquímica Southwestern.

Consiste en la determinación de la presencia y distribución del factor de transcripción NF – k β en su estado activo en el tejido o células , a través de una sonda específica de oligonucleótidos doble hebra marcados con biotina, la cual contiene la secuencia de consenso a la que se une NF – k β , ésta es :

NF – k β : sense : 5' – AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C- 3' – Biotina
Antisense : 5' – GCC TGG GAA AGT CCC CTC AACT T-3'

Las muestras de cortes de tejidos hechos a congelación y las células obtenidas en los diferentes ensayos experimentales, fueron preparados y montados en portaobjetos y sometidos a un lavado con buffer salino (PBS)/H₂O₂ al 10% v/v por 15 minutos a temperatura ambiente, con el fin de inactivar la peroxidasa endógena para evitar las reacciones inespecíficas en la etapa de revelado, luego fueron lavados con PBS durante 10 minutos, tras lo cual se fijaron con 0,2 % de paraformaldehído disuelto en PBS durante 30 minutos a 28° C. Posteriormente las preparaciones fueron digeridas con pepsina 0,5 % (433 U/mg) (Sigma Chemical Co, USA.) en HCl 1N a 37° C por 30 minutos en cámara húmeda, se procedió a lavar dos veces con buffer 1 durante 5 minutos y se trató con DNAsa I (0,2 mg/ml) (2000 U/mg) (Winkler) por 30 minutos a 37° C, y luego fueron lavados 2 veces en buffer 2 durante 5 minutos y deshidratados a concentraciones crecientes de etanol al 70 % , 96 % y 100 %, durante 3 minutos cada una. Finalizada esta etapa las muestras deshidratadas fueron incubadas con los oligonucleótidos marcados con biotina (50 pmoles/ml) en buffer 1 conteniendo 0,5 µg/ml poli dI-dC (Amershan Biociencias, USA.) durante toda la noche a 37° C en cámara húmeda.

Concluido el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas dos veces con buffer 1 y buffer 2 durante 5 minutos cada uno, para luego incubar con buffer de bloqueo una hora a temperatura ambiente. Luego de esto los cortes fueron incubados con Streptavidina- Peroxidasa (Sigma Chemical Co, USA) (1/250) en cámara húmeda durante 1 hora a 37° C, seguido de la aplicación de buffer de lavado 2 veces por 10 minutos cada una y acetato de sodio durante 10 minutos.

Finalmente se reveló la reacción, agregando sustrato EAC , en oscuridad a 37° C durante 30 minutos, la reacción se detuvo con agua destilada y los cortes fueron montados en PBS/glicerol para ser observados al microscopio.

3. RESULTADOS.

3.1 Respuesta inmune humoral.

3.1.1 Determinación de anticuerpos anti inmuno-globulina humana y anti *Brucella* en animales de experimentación tratados y no tratados con GJ-001.

Para la realización de estos ensayos se utilizaron 12 ratones por cada grupo experimental los cuales fueron inyectados con IgG humana al día 0 preparada con PBS o GJ-001, como controles negativos se inyectaron un grupo de ratones con GJ-001 solo y otro grupo con PBS. Los ratones fueron sangrados a los 7 y 14 días post –inoculación.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1 en que los animales inoculados con IgG h y GJ-001 presentan al día 7 y 14 una mayor cantidad de anticuerpos que los animales inyectados con IgG h y PBS, en tanto que los grupos controles inyectados con PBS o GJ-001 sólo presentan valores basales.

En un experimento similar en que se usó como antígeno la cepa vaccinal de *Brucella abortus* RB-51, se observa el mismo fenómeno, el grupo en que el antígeno fue suspendido en GJ-001 mostró un mayor nivel de anticuerpos que el grupo inyectado con el microorganismo suspendido en PBS (Figura 2).

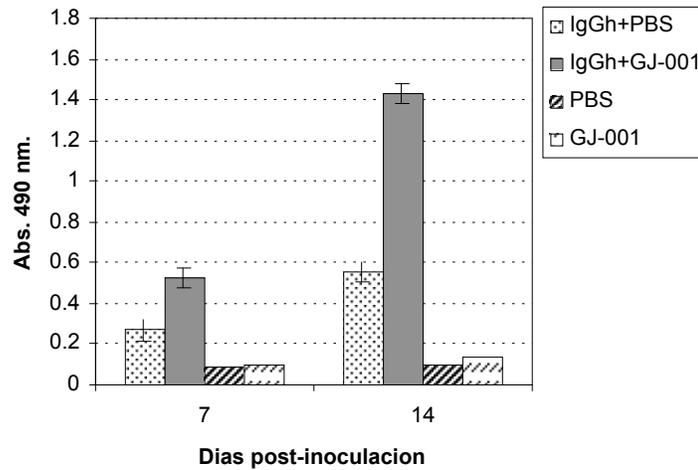


Figura 1. Niveles de anticuerpos expresados como absorbancia promedio para cada grupo de 8 ratones experimentales, inyectados con inmunoglobulina G humana disuelta en PBS o en GJ-001 como inmuno-modulador. Sueros obtenidos a los 7 y 14 Días post-inoculación. Nivel de significancia $P < 0,05$

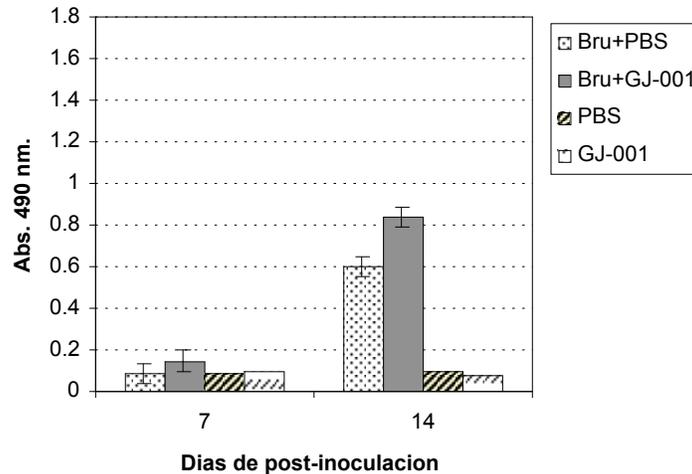


Figura 2. Niveles de anticuerpos expresados como absorbancia promedio para cada grupo de 8 ratones experimentales, inyectados con antígeno *B. abortus* RB-51 disuelta en PBS o en GJ-001 como inmuno-modulador. Sueros obtenidos a los 7 y 14 días post-inoculación. Nivel de significancia $P < 0,05$

3.1.2 Determinación del efecto adyuvante de la respuesta inmune humoral anti IgG h de el extracto de GJ-001 inyectado por vía intraperitoneal junto con el antígeno o en forma separada por vía subcutánea.

En la presente serie experimental se usaron tres grupos de ratones los que fueron inmunizados con IgG h . Uno de estos grupos recibió el antígeno disuelto en GJ-001, y los otros dos lo hicieron en PBS, uno de estos últimos grupos recibió adicionalmente GJ-001 por vía subcutánea, los otros dos fueron inyectados con PBS subcutáneo como control. En la figura 3, puede verse que GJ-001 administrada junto con el antígeno por vía intraperitoneal o en forma separada por vía subcutánea induce un mayor nivel de anticuerpos comparado con el antígeno sólo disuelto en PBS. Se debe hacer notar que el GJ-001, inyectado en forma subcutánea mostró también un efecto adyuvante cuando se administró junto con el antígeno vía intraperitoneal. En la misma figura 3, puede verse que el efecto descrito afecta a IgG total, y a las subclases de IgG1 e IgG 2a.

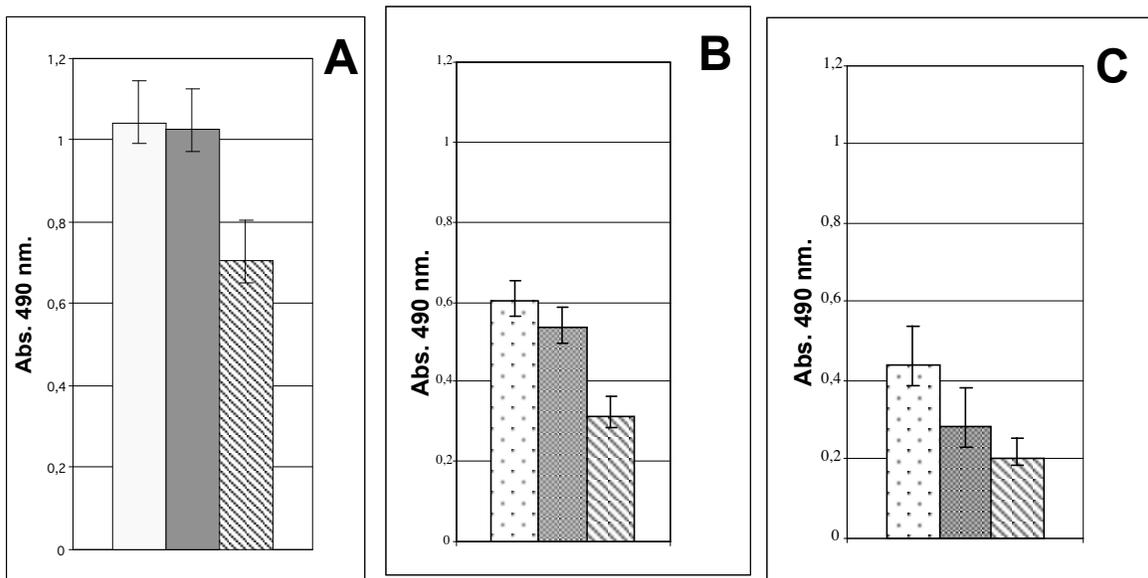


Figura 3A. Niveles de anticuerpos IgG totales (A), IgG1 (B) e IgG 2a (C), obtenidos en ratones inmunizados con IgG h disuelta en GJ-001 () IgGh disuelto en PBS e inoculados con GJ-001 por vía subcutánea (), o IgG h disuelta en PBS sin recibir adicionalmente GJ-001 ().

3.1.3 Determinación de IgG total y sub clases de anticuerpos específicos en animales de experimentación tratados con diferentes concentraciones de GJ-001.

Para la realización de estos ensayos se utilizaron 8 ratones por cada grupo experimental inmunizados con Inmunoglobulina G humana disuelta en GJ-001 a distintas concentraciones o en PBS como control.

Los resultados que se muestran en la figura 4 indican que las diferentes concentraciones de GJ-001 utilizadas en este ensayo, induce un aumento importante del título de IgG total y las subclases estudiadas con respecto al grupo que recibió el antígeno en PBS.

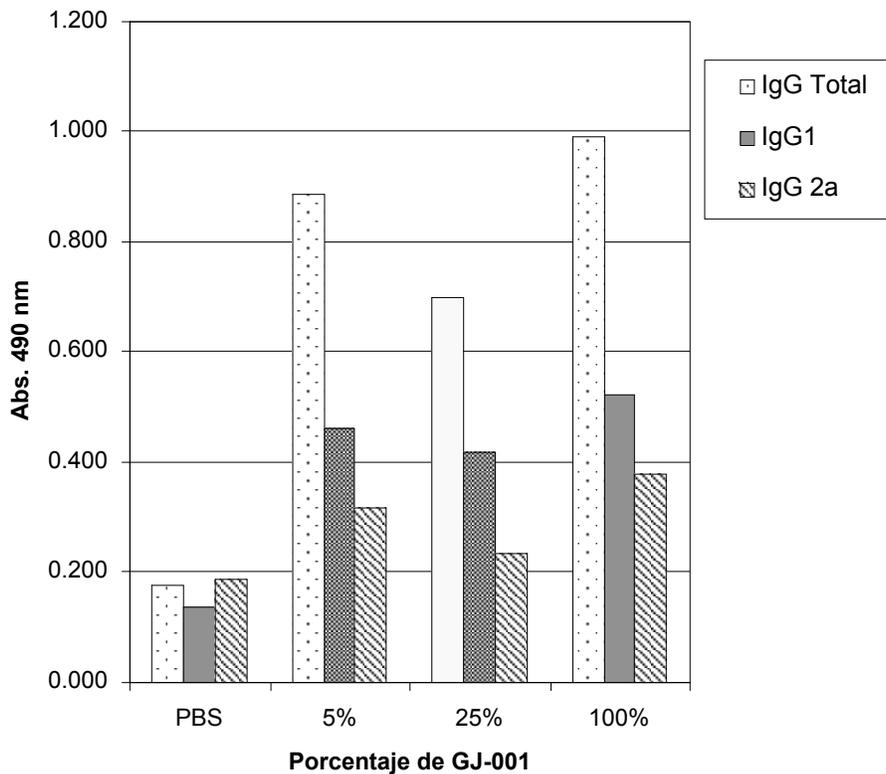


Figura 4. Niveles de anticuerpos anti-IgG h en grupos de 8 ratones inyectados con el antígeno disuelto en PBS y diferentes concentraciones de GJ-001.

3.1.4 Cinética de producción de IgG total y sub clases de anticuerpos específicos anti IgG h en animales de experimentación tratados con GJ-001.

Para estos ensayos se utilizaron grupos de ratones experimentales inmunizados con Inmunoglobulina G humana los cuales fueron sangrados a los 7,14 y 21 días post –inoculación, con GJ-001 como inmuno-modulador y PBS como control.

Los resultados mostrados en las figura 5 indican los niveles de anticuerpos expresados como absorbancias de los diferentes sangrados de cada grupo experimental y sus respectivos controles.

Como puede observarse, los niveles de IgG total, IgG 1 e IgG 2a en el grupo inyectado con el antígeno acompañado de GJ-001 permanece constantemente más elevado que el grupo inyectado con el antígeno solo disuelto en PBS.

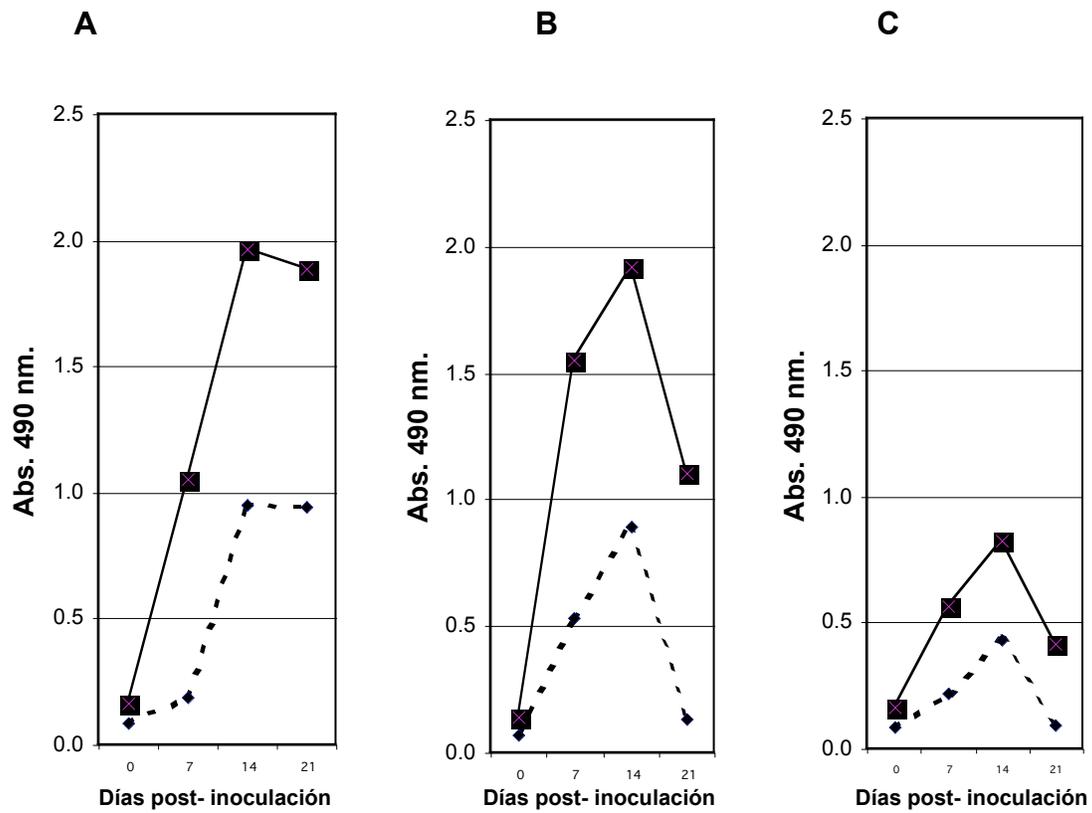


Figura 5. Niveles de anticuerpos IgG total (A), IgG 1 (B) e IgG 2a (C), en animales inyectados con IgG h acompañado con GJ-001 (—■—) o el control en que en antígeno se administro en PBS (X---X).

3.1.5 Efecto del extracto GJ-001 en la respuesta inmunológica primaria y secundaria.

En esta serie experimental, ratones RK, fueron inyectados con IgG h disuelta en GJ-001 o en PBS al día 0, luego fueron sangrados los días 15 y 30 post inmunización. Al día 30 del experimento, los ratones fueron re-inmunizados con el antígeno solo y sangrados posteriormente los días 37 y 45 post segunda inmunización. Los resultados mostrados en la figura 6 demuestran que GJ-001 induce un aumento de la producción de anticuerpos a los 37 y 45 días post-inoculación comparado con el grupo control inyectado con PBS, sin embargo, este grupo experimental no es capaz de montar una respuesta secundaria frente a la re-inmunización, como efectivamente lo hace el grupo inmunizado con el antígeno solo.

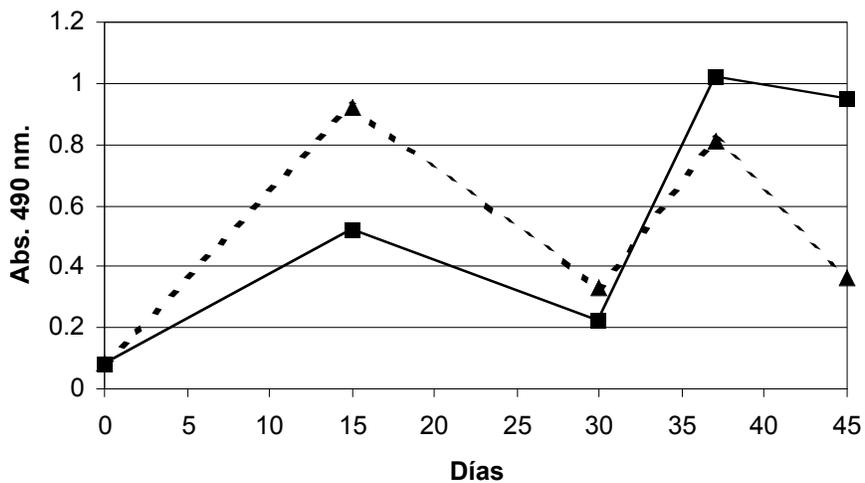


Figura 6. Niveles de anticuerpos anti IgG h en ratones que recibieron GJ-001 (▲-- --▲) o PBS (■—■) junto con el antígeno en la primera inmunización y el antígeno solo en PBS en la segunda inmunización.

3.2 Respuesta inmune celular.

3.2.1 Respuesta blastogénica en ratones inmunizados con *Brucella* sola o acompañada de GJ-001.

La respuesta blastogénica de células esplénicas de ratones inmunizados con *B. abortus* RB-51, fue determinada mediante la incorporación de timidina tritiada en cultivos estimulados con diferentes cantidades de microorganismos. En esta serie experimental se comparó la cantidad de timidina tritiada incorporada en animales que recibieron GJ-001 junto con el antígeno y animales que recibieron el antígeno con PBS. En la figura 7 puede verse que la incorporación de timidina tritiada en el grupo control que no recibió GJ-001 fue mayor que la que recibió el inmuno-estimulante. Este resultado se repitió varias veces comprobando que efectivamente GJ-001 baja la respuesta blastogénica “*in vitro*”.

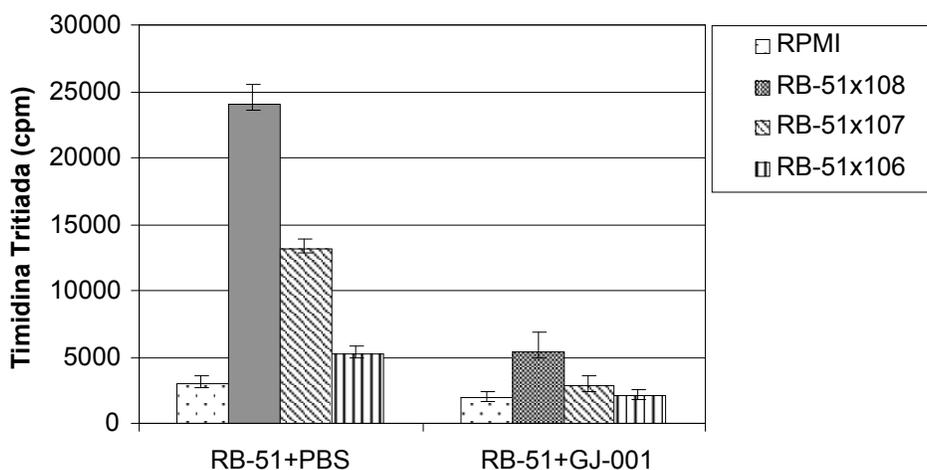


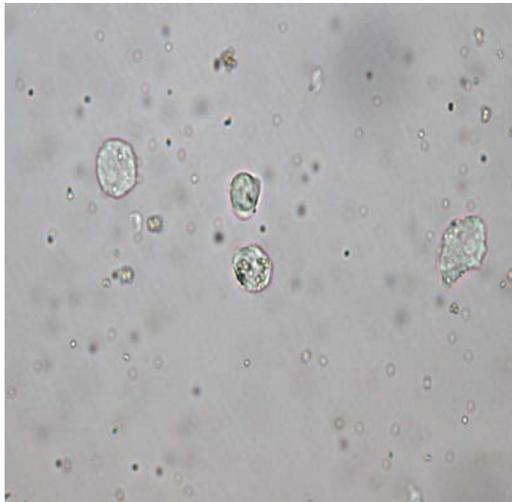
Figura 7. Respuesta linfoproliferativa de linfocitos provenientes de ratones inmunizados con RB-51 en presencia o ausencia de GJ-001, estimulados con el antígeno *B. abortus* RB-51 en cantidades de 10^8 (■), 10^7 (▨) o 10^6 (▧) bacterias por ml.

3.3 Inmunidad Innata.

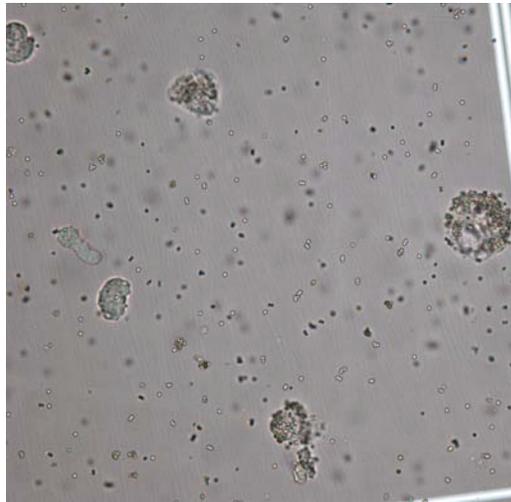
3.3.1 Incorporación de microesferas fluorescentes por macrófagos J774.2 y activados con GJ-001.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de GJ-001 de estimular la fagocitosis en células J774.2, estas células fueron incubadas en placas de cultivo de 24 pocillos por 12 horas a 37 ° C en presencia o ausencia de GJ-001, pasado este tiempo se adicionó a cada pocillo 40 ul de microesferas de látex, 30 minutos mas tarde, se tomó una alícuota de las células y se observaron a microscopia de fluorescencia y óptica, para finalmente ser fotografiadas.

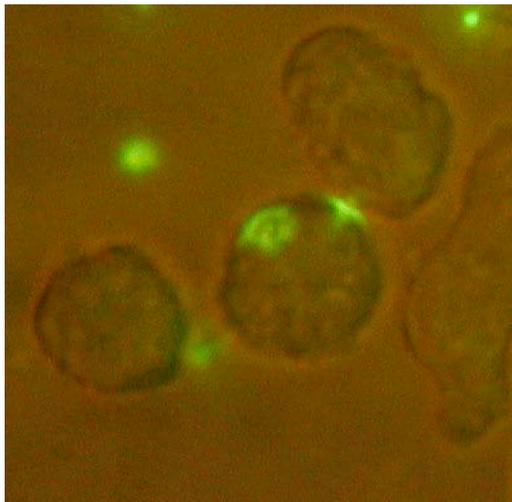
En la figura 8 puede verse la fagocitosis de esferas fluorescentes en células J774.2 en ausencia (A) y presencia de GJ-001 (B) con un aumento de 200 X, lo mismo pude observarse en los microfotografías C y D en los que a mayor aumento se repite el aumento de partículas fluorescentes a nivel citoplasmático en las células cultivadas en presencia de GJ-001, comparado con el control en medio de cultivo solo.



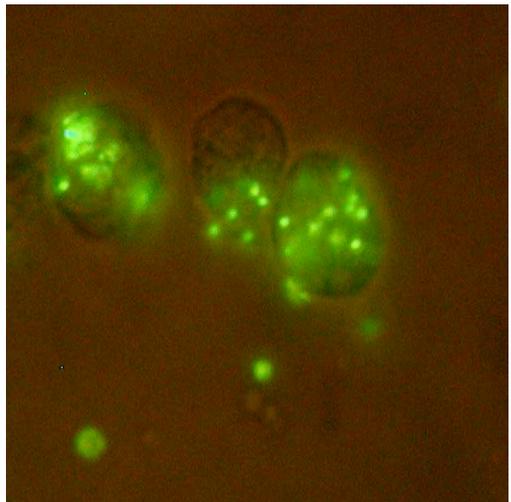
A



B



C



D

Figura 8. Fagocitosis de partículas fluorescentes en células J774.2, incubadas en medio de cultivo sólo (A y C) o medio con GJ-001 (B y D).

3.3.2 Aumento de la incorporación de Rojo neutro en macrófagos J774.2 activados con GJ-001.

Con la finalidad de evaluar el aumento de la actividad de los macrófagos J774.2 mediante la incorporación de rojo neutro. Se procedió a incubar en placas con los cultivos celulares por 12 horas las células con y sin extracto total de GJ-001. Luego a cada cultivo se adicionó 40 ul de rojo neutro y pasados 45 minutos, se tomo una alícuota de células que fueron observadas y fotografiadas en el microscopio.

Las figura 9 A muestra a las células que recibieron 25 ul de GJ-001 por ml de cultivo, acá se puede observar una marcada incorporación de rojo neutro, al contrario de lo que se ve en la figura 9 B que corresponde a las células que no recibieron extracto de GJ-001, que incorporan baja cantidad de colorante.

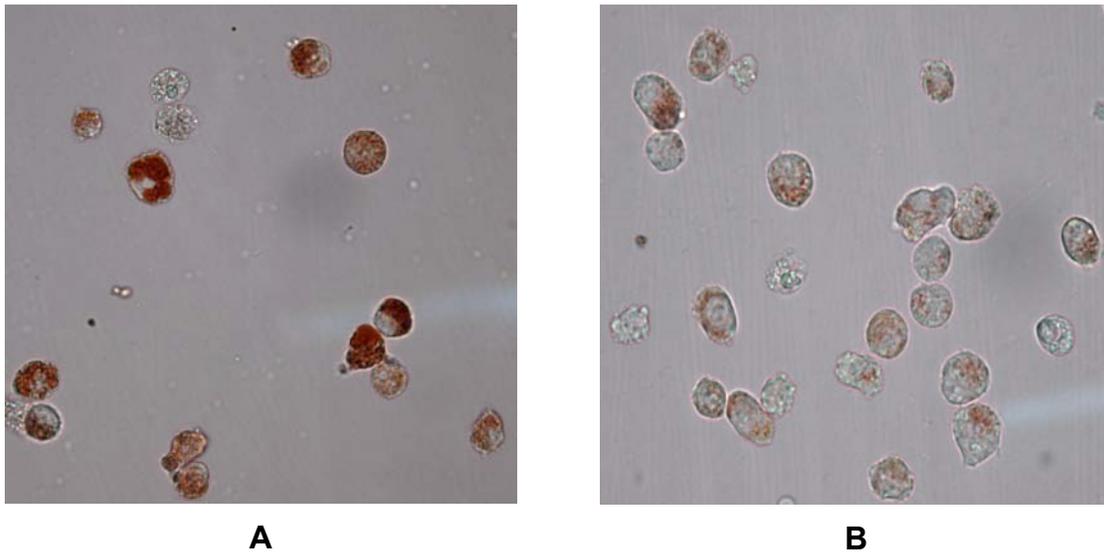


Figura 9A y B. Fagocitosis de partículas de rojo neutro en células J774.2 incubadas con extracto de GJ-001 (A) y la incorporación de colorante en ausencia de GJ-001 (B). (aumento 400x).

3.3.3 Efecto del tiempo de presencia de GJ-001 en cultivo con células J774.2, en su capacidad fagocítica.

Con el fin de determinar si el tiempo de incubación de las células J774.2 con GJ-001, tendría algún efecto en el aumento de la capacidad fagocítica que como se ha demostrado GJ-001 es capaz de inducir, se dispusieron cultivos celulares a los que se agregó GJ-001 a diferentes tiempos de iniciado el experimento, para luego de un total de 12 horas medir la capacidad de incorporación de rojo neutro y compararlo con el cultivo control que no recibió el extracto en estudio. En la figura 10 se muestra un experimento representativo de esta serie y puede verse que GJ-001 induce dos efectos que se repiten en todos los experimentos efectuados: GJ-001, inicialmente las 2 primeras horas produce una caída de la actividad fagocítica con respecto al control sin el extracto para luego, a medida que el tiempo en presencia de GJ-001 aumenta, se incrementa la capacidad de endocitar rojo neutro, en otras palabras se puede concluir que el aumento de la capacidad fagocítica es un fenómeno complejo que requiere mas de seis horas para expresarse.

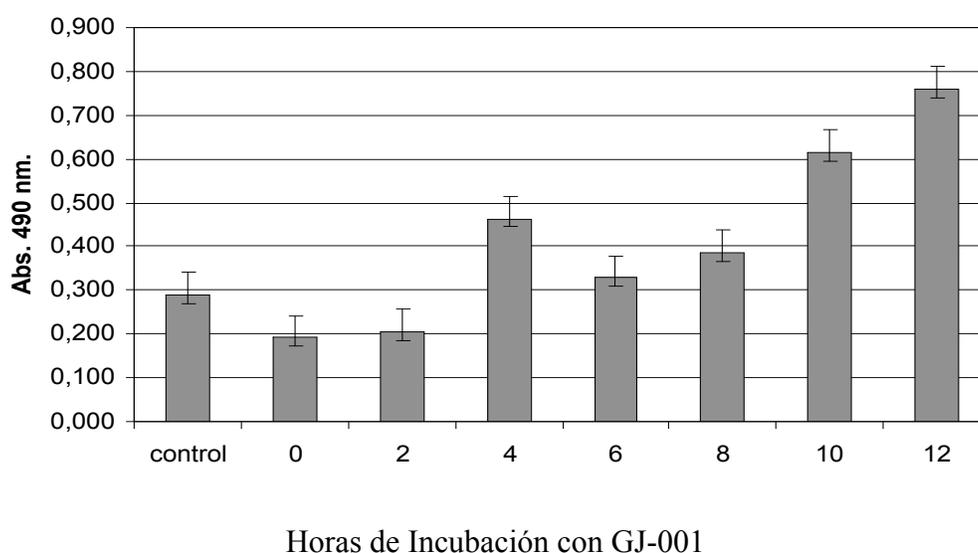


Figura 10. Efecto del tiempo de exposición de las células J774.2, a GJ-001.

3.3.4 Grado de activación de NF- κ B aplicando Inmunocitoquímica Southwestern, en macrófagos J774.2 incubadas con GJ-001.

Como puede verse en la figura 11, células incubadas con GJ-001 pero sin sonda como control negativo no muestran tinción nuclear (A), células incubadas con sonda pero sin GJ-001 muestran una tinción nuclear apenas perceptible (B), en cambio en los cultivos que recibieron la sonda y el extracto en cantidades de 10 μ l/ml (C) o 100 μ l/ml (D) la tinción se hace extraordinariamente fuerte, indicando una gran actividad de NF- κ B producto de la presencia de GJ-001.

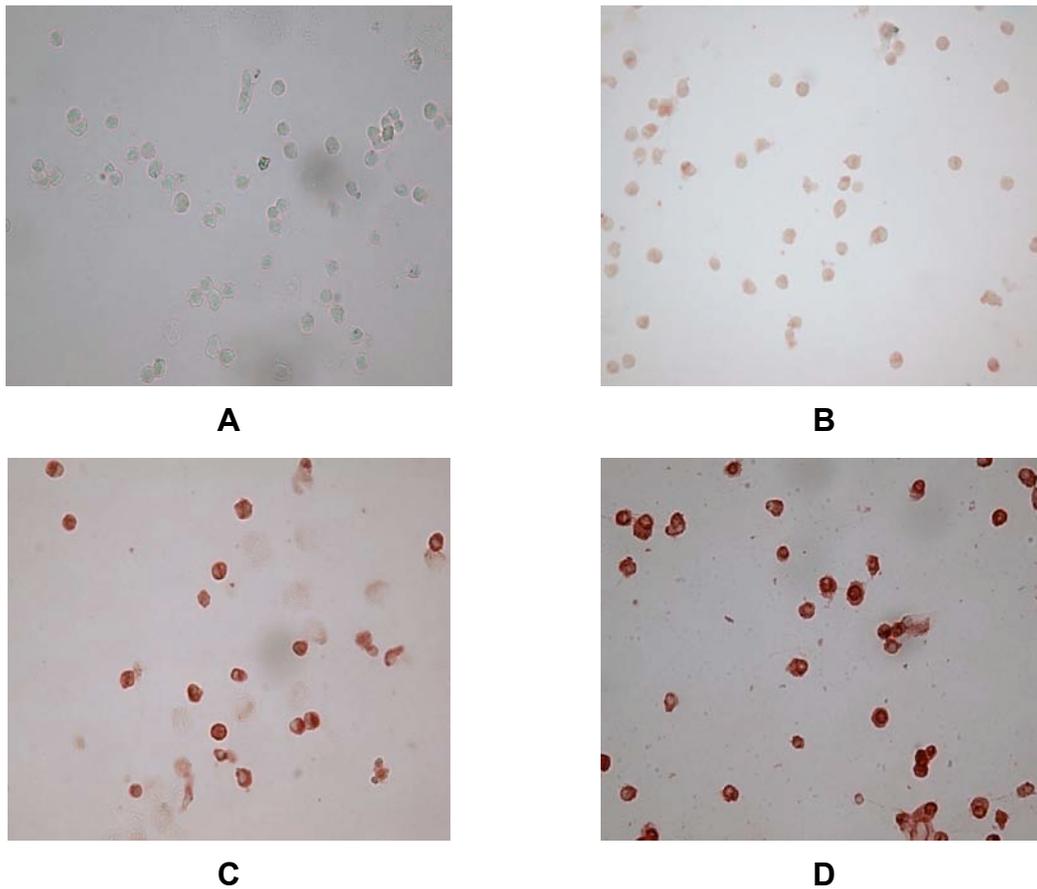


Figura 11. Microfotografía mostrando los resultados de SW para NF- κ B en células J774.2, se puede ver que las células sin sonda como control negativo no muestran marca (A) las células en condiciones de cultivo basal incubadas con sonda muestran una moderada actividad de NF- κ B (B) en cambio las células incubadas en presencia de 10 o 100 μ l/ml de GJ-001 muestran una notable actividad de NF- κ B (C y D respectivamente).

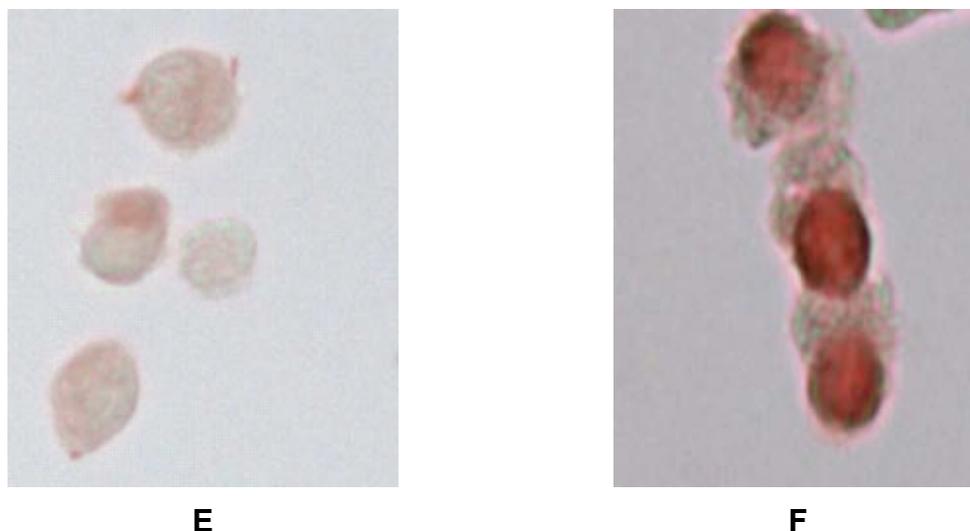


Figura 12. Microfotografía mostrando a mayor aumento (400X) la activación de NF-k β en células sin GJ-001 (E) o incubadas en presencia de 100 ul/ml del extracto en estudio (F).

3.4 Respuesta Autoinmune.

3.4.1 Determinación de anticuerpos anti-Tiroglobulina en animales de experimentación, tratados con *E. purpúrea*, Andrografolido y GJ-001 como inmuno-moduladores.

Para la determinación de anticuerpos anti-Tiroglobulina (Tg), se siguió el esquema de inmunización descrito anteriormente y los ratones de los distintos grupos experimentales fueron sangrados a los 7 y 14 días post- inoculación.

La figura 13 muestra los valores de absorbancia promedios de los sueros obtenidos de los ensayos, en que se uso GJ-001, *Echinacea* o Andrografolido. En estos observamos que en el grupo experimental tratado con GJ-001 presenta una clara disminución del título de anticuerpos obtenidos en ambas sangrías, con respecto al control inyectado con el antígeno solamente. Por el contrario los grupos experimentales tratados con *Echinacea* y Andrografolido como inmuno-moduladores parecieran no presentar variaciones en el título de anticuerpos o incluso en el caso de andrografolido, los animales tratados con esta molécula muestran una mayor cantidad de anticuerpos con respecto al control.

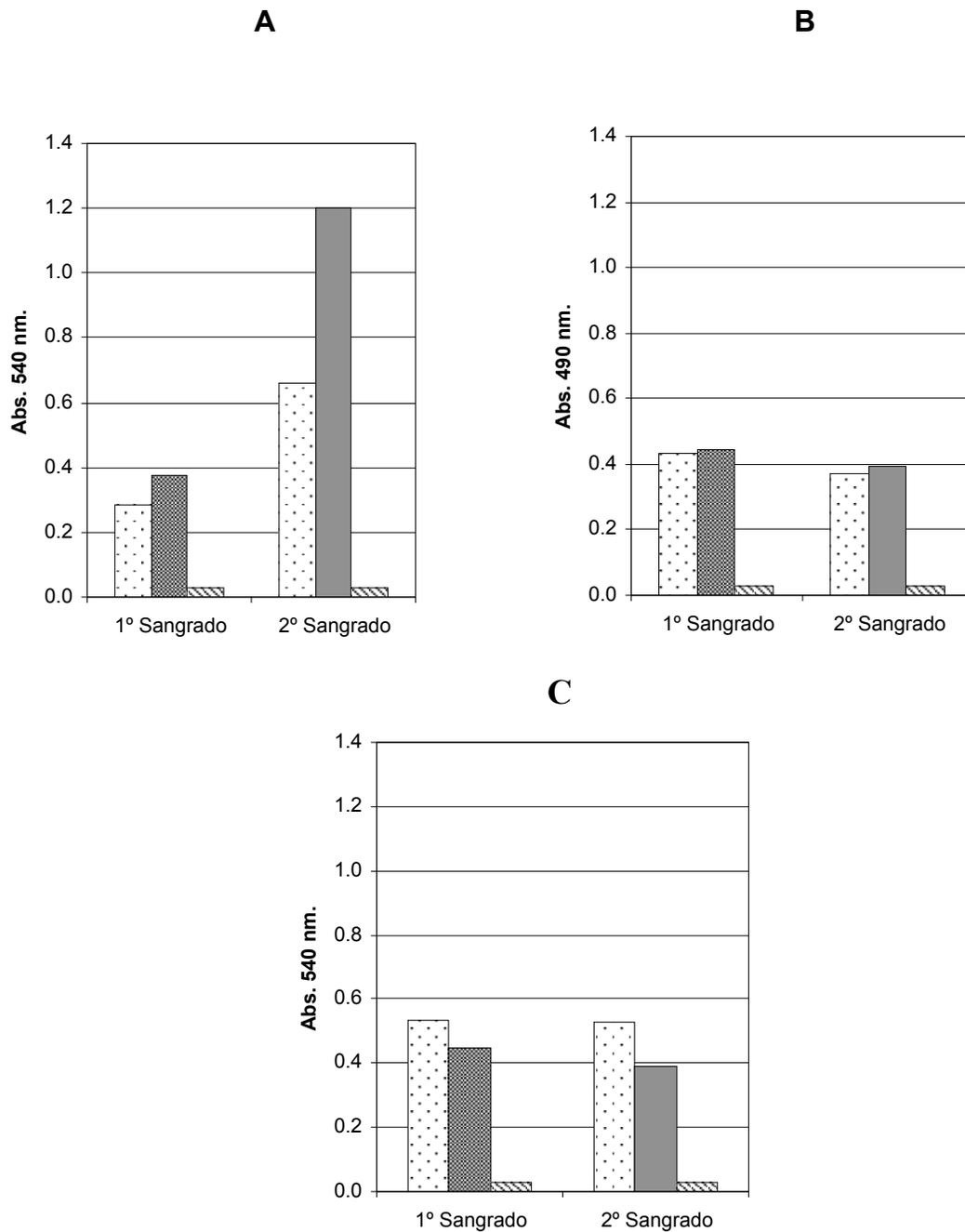


Figura 13: Niveles de anticuerpos anti-Tg en grupos de animales inmunizados con el antígeno mas LPS como coadyuvante y adicionalmente tratados con GJ-001 (A) Echinacea (B) y Andrografolido (C). En cada experimento se muestra los resultados de los grupos experimentales con el inmunomodulador (▤) y en ausencia del inmunomodulador (▥) o los animales no inmunizados (▧) como controles. Nivel de significancia $P < 0,05$

4. DISCUSIÓN.

Los resultados de los diferentes ensayos experimentales presentados en este trabajo, permiten afirmar que el extracto acuoso, obtenido de esta planta autóctona que hemos llamado GJ-001, cuando es inyectado junto con el antígeno induce un aumento de la producción de anticuerpos, hecho que es absolutamente repetible. El efecto antes mencionado es demostrable cuando, en ratones se usa como antígeno inmunoglobulina humana, que como se sabe es una proteína de alrededor de 150Kd, la cepa vaccinal viva de *Brucella abortus*, que constituye un antígeno altamente complejo en su composición y de otros antígenos que fueron utilizados y no reportados en este trabajo, demostrando entonces que esto es un fenómeno general. También es evidente que la vía de administración no necesariamente debe ser la misma que el antígeno, ya que inyectado por vía subcutánea en animales inmunizados por vía intraperitoneal produjo el mismo efecto. Este extracto vegetal con las propiedades antes descritas tiene un efecto potente ya que actúa a baja concentración como fue demostrado en estos experimentos.

Cuando se estudió la respuesta inmune primaria y secundaria, quedó en evidencia que si bien GJ-001 aumenta la respuesta primaria, su administración bloquea la respuesta inmune secundaria, que depende de la memoria inmunológica, fundamentalmente dada por linfocitos T de memoria, esto podría ser explicado si se piensa que GJ-001 facilita de alguna forma el accionar de las células B progenitoras de las células plasmáticas productoras de anticuerpos y que en este efecto "facilitante" los linfocitos T helper tienen poca incidencia. Esta posible interpretación de los resultados se ve apoyada por el efecto negativo que GJ-001 tiene sobre la respuesta inmune celular medida como transformación blástica. Si la técnica de transformación blástica, tal como lo ha sugerido (Rose, et al., 1997) refleja el accionar de la rama celular de la respuesta inmune celular, esta estaría parcialmente suprimida. Este efecto antagónico que puede existir sobre las respuestas inmune humoral y celular, que inicialmente sorprende, no es

un fenómeno extraño en inmunología, ya que algo similar, aunque de efecto inverso ha sido descrito para andrografolido, un principio activo obtenido de *Andrographys paniculata* el cual, en este mismo laboratorio se ha demostrado que este a bajas dosis aumenta la actividad de células T pero no la de las células B, con el consiguiente aumento de la respuesta inmune celular y un nulo efecto a nivel de la respuesta inmune humoral (Folch, et al., 2004). Este efecto supresor de la respuesta inmune celular demostrado por GJ-001, abre la posibilidad de su uso como modulador de efectos nocivos mediados por linfocitos T como es el caso de algunas enfermedades autoinmunes o de cuadros de hipersensibilidad retardada.

El efecto regulador de GJ-001, podría por otra parte, estar radicado en las células presentadoras profesionales, que como se sabe son células dendríticas, macrófagos y células B ya que como lo hemos demostrado en los ensayos experimentales, GJ-001 aumenta en forma muy consistente la expresión de NF- κ B en células macrófagicas contrario también a lo que ocurre con andrografolido sobre las células dendríticas (Iruretagoyen, et al., 2005) importante en el procesamiento y presentación del antígeno a las células T.

Con respecto a los resultados encontrados en la respuesta a Tg singénica, se ve que GJ-001 disminuye los títulos de auto-anticuerpos, esto no es de extrañar ya que podría explicarse por la protección que el extracto causa en la glándula tiroidea al prevenir su destrucción por los elementos efectores dependientes de la respuesta inmune celular, de tal manera que a la producción inicial de anticuerpos producto de la inmunización no sigue en este caso la perpetuación de la liberación de antígeno por destrucción de la glándula y por lo tanto, previene la auto-inmunización crónica.

De estos resultados podemos concluir que GJ-001 es un inmuno-modulador interesante que potencia solo la producción de anticuerpos e inhibe la respuesta inmune celular. Finalmente, para plantear un posible uso terapéutico de este preparado, se sugieren estudios mas acabados que deben continuarse en el futuro.

5. CONCLUSIONES

- 1 El extracto total GJ-001 tiene características de inmuno-modulador.
- 2 La respuesta inmune humoral primaria se ve favorecida con la utilización del extracto total de GJ-001 en animales de experimentación.
- 3 GJ-001, presenta una clara tendencia a disminuir la respuesta inmune-celular en animales de experimentación.
- 4 GJ-001, estimula de manera importante la actividad macrofágica y por lo tanto, la inmunidad innata.
- 5 Este aumento de la actividad macrofágica, se hace mayor con el tiempo y la concentración.
- 6 GJ-001 produce una activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, la cual es mayor con las concentraciones del extracto utilizadas.
- 7 La utilización de GJ-001, en la inducción de TAE no produce un aumento de los títulos de anticuerpos anti-tiroglobulina..

6. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., (1988) A reassessment of the mechanism of antigen specific T cell dependent B- cell activation. *Immunol. Today* 9: 89-94

Akira S. and Kishimoto T. (1997) NF-IL-6 and NF-Kb in cytokine gene regulation. *Adv. Immunol.* 65: 1-25.

Barin J.G., Afanasyeva M., Talor M.V., Rose N.R., Burek C.L. and Caturegli P. (2003) Thyroid-specific expression of IFN- γ limits experimental autoimmune thyroiditis by suppressing lymphocyte activation in cervical lymph nodes. *J. Immunol.* 170: 5523-5529.

Barnes P.J. and Karin M. (1997) Nuclear factor-kB. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336: 1066-1071.

Braley-Mullen H., Johnson M., Sharp. and Kiriakos. (1985) Induction of experimental autoimmune thyroiditis in mice with in vitro activated splenic T cell. *Cell. Immunol.* 93:132-143.

Esquivel.,P. Rose N.R. and Kong Y.M. (1977) Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 145: 1250-1262.

Flesch., I. and Kaufmann, S. H. E. (1989) Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 138: 4408-4413.

Folch.,H. Oñate., A. Barria., M. Burgos., R. Hanque.,J. and Ortega., M. (2004) Immunomodulatory effect of Andrographolide: Selective potentiation of Th-1 response against *Brucella abortus* in mice . Immunology 2004: 353-357.

Gan., X-H. Zhang., L. Heber., D. Bonavida., B. (2003) Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by Echinacea water soluble extracts: recruitment of lymphocyte-target conjugates and killer cells and activation of programming for lysis. Internat. Immunopharmacol. 3 : 811-824.

Gurley, B.,Gardner, S.F. And Hubbard, M.A . (2004) In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: *Citrus aurantiun*, *Echinacea purpurea*, milk thistle , and saw palmetto. Clin. Pharmacol.Therap. 76(5) : 428-440.

Iruretagoyena M., Tobar JA, Gonzalez PA, Sepúlveda SE, Figueroa CA, Burgos RA, Hanke JL y Kalergis AM. (2005) Andrographolide interferes with T cell activation and reduce experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. J.Pharmacol.Exp. Ther. 312: 366-372.

Montes., M. Wilkomirsky.,T and Valenzuela .,L. (1992) Plantas medicinales . Ediciones Universidad de Concepción . Concepción. Chile.

Mossman. T. R., Chervinski, H., Gieldin, M., and Coffmann R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine and secreted proteins. J. Immunol. 136: 2348-2357.

Norikazu. H., Lewis C., Vasko. V., (2005) . Thyrocytes express a functional Toll-like receptor 3 (TLR3): Overexpression can be induced by viral infection and reversed by phenylmethimazole and is associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. Mol. Endocrinol. 19:1231-1250.

Roitt, I., Brostoff, J. y Male, (Ed.) Inmunología. 4 Ed. .(1997).

Rose NR, Conway de Macairo, Fold JD, Lane C y Nakamura RM (Ed) Manual of Clinical Laboratory Immunology. 5th Edition, ASM Press, 1997.

Sharapin., N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Editor Roberto Punzón S. Santafe de Bogota, D.C. Colombia.

Stimpel., M. Proksch.,A. Wagner., H. and Matthes-Lohmann., M.I.(1984)Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. Infect. Immun. 46: 845-849.

Wang S.H., Bretz J.D., Phelps E., Mezosi E., Arscott P.L., Utsugi S. and Baker J.R. (2002) A unique combination of inflammatory cytokines enhances apoptosis of thyroid follicular cells and transforms nondestructive to destructive thyroiditis in experimental autoimmune thyroiditis. J. Immunol. 168: 2470-2474.

Yu S., Sharp G.C., Braley-mullen H. (2002) Dual roles for IFN- γ , but not for IL-4, in spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. J. Immunol. 169: 3999-4007.

7. ANEXO

1. Buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,2):

Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	13,7 gr.
KH ₂ PO ₄	6,9 gr.
NaCl	36,1 gr.
H ₂ O destilada c.s.p.	1000,0 ml.

Se amacena a 4° C y se diluye 1:4 con agua destilada previo a su utilización.

Ajustar pH con Na OH 10 %, hasta pH 7,2

2. RPMI-1640 incompleto:

Adicionar medio RPMI-1640

Na HCO₃ (27 mM), HEPES (10 mM.)

Completar a 1000 ml con agua destilada .

Esterilizar por filtración y guardar entre 2° C a 8° C en oscuridad, pH 7,2.

3. RPMI-1640 completo:

El medio RPMI-1640 incompleto fue suplementado con piruvato de sodio (10⁻³ M)

Penicilina (126 UI/ml)

Estreptomina (7,5x10⁻³ M)

2-mercaptoetanol (5x10⁵ M)

Anfotericina B (2,5 ug/ml)

Suero bovino fetal estéril (10%).

Almacenar en oscuridad entre 2° C a 8° C.

4. RPMI-1640 completo sin antibióticos:

El medio RPMI-1640 incompleto fue suplementado con piruvato de sodio (10⁻³ M)

2 mercaptoetanol (5x10⁵ M)

Suero bovino fetal estéril (10 %)

Almacenar en oscuridad entre 2° C a 8° C

5. RPMI-1640 completo sin gentamicina:

Se prepararon dos medios con concentraciones distintas de gentamicina, para esto, se procedió de la siguiente forma:

Primer medio se agrego 50 ug de gentamicina por ml de RPMI-1640 completo

Segundo medio se agrego 12,5 ug de gentamicina por ml de RPMI-1640 completo

6. Medio para congelar células :

RPMI-1640 completo	40 %
Suero bovino fetal	50 %
Dimetil sulfoxido (DMSO)	10 %

7. Solución de Azul de Tripán:

Preparar azul de tripan al 0,07 % en agua destilada, guardar a temperatura ambiente hasta por 4 meses.

8. Ficoll-Hypaque (d = 1,077 g/ml):

Ficoll	5,7 gr.
Solución Hypaque	18,0 ml
H ₂ O destilada estéril c.s.p.	100,0 ml.

Filtra y almacenar en alícuotas de 20 ml hasta su uso, a temperatura ambiente o a 4° C.

9. Solución de centelleo:

2,5-diphenil-oxazole (PPO)	4,0 gr.
2,2-phenilen-bis-(5-pheniloxazol) (POPOP)	0,2 gr.
Tolueno c.s.p.	1000,0 ml.

Se agita por toda la noche en un frasco ámbar , y se almacena a temperatura ambiente.

10. Solución tampón de pegada 0,08 M:

Na ₂ CO ₃	1,6 gr.
NaHCO ₃	2,9 gr.
H ₂ O destilada c.s.p.	1000,0 ml.

Se prepara esta solución en fresco y se guarda a 4° C

11. Solución bloqueadora tween 20:

Tween 20	0,5 %
PBS c.s.p	100,0 ml.

12. Solución de lavado (Tween 20-PBS):

Tween 20	0,05 %
PBS c.s.p	100,00 ml.

13. Solución de revelado:

Ortofenilendiamina	0,0040 %
H ₂ O ₂ 20 % v/v	0,0012 %
Acido cítrico	0,1000 M.
NaH ₂ PO ₄	0,2000 M.
H ₂ O destilada c.s.p.	10,0000 ml.

14. Solución de parada 2,5 M:

H ₂ SO ₄	18 M.
H ₂ O destilada c.s.p.	100 ml.

15. Buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,5:

NaHCO ₃	8,4 gr.
Na ₂ CO ₃	3,6 gr.
H ₂ O c.s.p.	1000,0 ml.

Ajustar a pH 9,5 con NaOH 5 M o HCl 2 M. Almacenar a 4° C y 8° C

16. Solución de bloqueo:

Leche descremada	5 gr.
PBS	10 ml.
H ₂ O destilada c.s.p.	100 ml.

17. Suero Fisiológico:

NaCl	9,0 gr.
H ₂ O destilada	1000,0 ml.

18. Solución de Lisis:

Dodesil sulfato de sodio (SDS)	10,0 %
Acido acético	0,5 M.
Agua destilada c.p.s.	100,0 %

19. Caldo Trypticase de soya :

Digerido pancreático de caseína	17,0 g/l.
Digerido enzimático de soya	3,0 g/l.
Dextrosa	2,5 g/l.
Cloruro de sodio	5,0 g/l.
Fosfato di potásico	2,5 g/l.

Disolver 30 gr del polvo en un litro de agua desmineralizada por calentamiento en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor . Tratar en autoclave (121° C por 15 minutos), pH final 7,3 +/- 0,2 a 25° C. Dodesil sulfato de

sodio (SDS)	10 %
Acido acético	0,5 M.
Agua destilada c.p.s.	100 ml.

20. Buffer 1 (5X):

HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	1,19 gr.
NaCl	1,17 gr.
MgCl ₂	1,00 gr.
EDTA	0,15 gr.
DTT (1M)	100 ul.
H ₂ O destilada c.p.s.	100 ml.

BSA, para 100 ml de buffer 1 (1x), pesar 0,25 gr de BSA y disolver en 20 ml de buffer1 (5x). Ajustar pH 7,4 con NaOH 1 M. Guardar a 4° C.

21. Buffer 2 (5x):

HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	1,19 gr.
NaCl	1,17 gr.
MgCl ₂	1,00 gr.
EDTA	0,15 gr.
DTT (1M)	100 ul.
H ₂ O destilada c.p.s.	100 ml.

BSA, para 100 ml de buffer 2 (1x), pesar 0,25 gr de BSA y disolver en 20 ml de buffer2 (5x). Ajustar pH 7,4 con NaOH 1 M. Guardar a 4° C.

22. Buffer de lavado:

Acido maleico	1,16 gr.
NaCl	0,88 gr.
Tween 20	30,0 ul.
Buffer 1 (5x)	20,0 ml.
BSA 0,25 %	20,0 ml
DTT (1M)	100,0 ul.
H ₂ O destilada c.p.s.	100 ml.

Ajustar pH a 7,5 con NaOH 0,5 M. Guardar a 4° C.

23. Buffer de Bloqueo:

Buffer de Lavado	45,0 ml.
Buffer Citrato de Sodio (SSC) (20X)	25,0 ul.
Laurel sulfato de sodio (SDS)	5,0 mg.
H ₂ O destilada	4,9 ml.
Ajustar a pH 7,0.	

24. Buffer Citrato de Sodio SSC (20X):

NaCl	17,6 gr.
Citrato de Sodio	7,7 gr.
H ₂ O destilada.	100,0 ml.
Ajustar a pH 7.0	

25. Sustrato AEC (3- Amino-9 etil carbazole):

AEC	4mg.
Dimetil-sulfoxido (DMSO)	1ml.
Duración 10 a 14 días protegido de la luz a temperatura ambiente.	
Preparar el sustrato al momento de usar, para ello:	
AEC stock	25ul.
H ₂ O ₂ (30v/v)	5ul.
Buffer Acetato de Sodio 0.17M a pH 5.2	1ml.

26. Pepsina 0,5%:

Actividad enzimática: 433 U/mg en 0.01gr

Solución Stock: Pesar 1mg de Pepsina y disolver en 5.22ml de HCl 1N.

Para el experimento se toman 125ul de la solución stock en 1 ml de HCl 1N.