



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

**“ESTUDIO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS ANDROGRAFOLIDO Y
14-DEOXIANDROGRAFOLIDO SOBRE LA SINTESIS DE DNA DE
LINFOCITOS T EN CULTIVO”.**

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

XIMENA ANDREA SACRE PIZARRO

VALDIVIA-CHILE

2007

*Dedicado a mis padres Luís y Mirtha,
a mi esposo Mauricio y mi hijo Ignacio.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le doy gracias a Dios y a la Virgen de Andacollo por darme la fortaleza para lograr esta meta.

En forma muy especial a mis padres, porque gracias a su sacrificio, apoyo constante y la confianza que me brindaron en todos estos años, me permitieron salir adelante y no rendirme en los momentos difíciles.

Al Doctor Hugo Folch por la confianza que depositó en mí, por toda su ayuda y apoyo durante la realización de esta tesis, buena disposición y por sobre todo paciencia.

A mi esposo Mauricio por darme las fuerzas necesarias para llegar al final, por su amor, paciencia y apoyo, al igual que mis amigos Alejandra y Eric.

Finalmente a mi hijo Ignacio por ser mi principal incentivo y motor de vida.

INDICE

1.- Resumen	3
2.- Summary	4
3.- Introducción.	5
4.- Materiales y método.	10
4.1.- Obtención de las células.	
4.1.1.- Linfocitos humanos.	10
4.1.2.- Linfocitos de ratón.	10
4.2.- Cultivo de linfocitos humanos y de ratón.	11
4.2.1.- Preparación y cultivo de células.	11
4.2.2.- Evaluación de la respuesta blastogénica.	12
4.3.- Antígeno, mitógeno y principios activos usados en los cultivos celulares.	13
5.- Resultados.	14
5.1.- Efecto de Andrografolido en la estimulación “ <i>in vitro</i> ” de linfocitos de ratón estimulados o no con ConA.	14
5.2.- Estudio del rango de dosis en que andrografolido estimula “ <i>in vitro</i> ” la síntesis de DNA en linfocitos de ratón.	19
5.3.- Estudio del efecto de 14 - deoxiandrografolido en la síntesis de DNA de linfocitos esplénicos de ratones normales.	22
5.4.- Estudio de la síntesis de DNA en linfocitos esplénicos provenientes de ratones tratados previamente con Andrografolido.	26

5.5.- Estudio de la síntesis de DNA en linfocitos humanos incubados	
“ <i>in vitro</i> ” con el mitógeno ConA y con <i>Mycobacterium</i> como antígeno.	29
4.- Discusión.	32
5.- Bibliografía.	35
6.- Anexos	39

1. - RESUMEN

La complejidad del sistema inmunológico hace difícil la existencia de una real alternativa para incrementar o generar una eficaz respuesta inmune frente a los agentes infecciosos que nos rodean. Con este fin en el presente trabajo se estudió el efecto sobre este sistema de los principios activos andrografolido (AP) y 14 – deoxiandrografolido (DAP), obtenidos ambos de la planta de origen asiático, *Andrographis paniculata*, la cual ha sido utilizada durante siglos para tratar infecciones respiratorias superiores, fiebre, herpes, y una variedad de otras enfermedades infecciosas tanto crónicas como agudas. Para lograr esto se utilizó la técnica conocida como transformación blástica que consiste en un ensayo “*in vitro*” para evaluar la capacidad de respuesta de las células linfoides, y de proliferar frente a un estímulo. Para lograr este objetivo se realizaron cultivos con células provenientes del bazo de ratones RK o de linfocitos humanos provenientes de donadores voluntarios, que fueron estimuladas con antígeno bacteriano proveniente de *Mycobacterium* o con el mitógeno Concanavalina A (ConA) y diferentes concentraciones de los principios activos en estudio. Los resultados obtenidos muestran que andrografolido administrado “*in vitro*” sólo a células esplénicas a la dosis de 0.5 nM, aumenta la síntesis de DNA en los cultivos control mientras que la disminuye en los cultivos que poseían ConA. Por otro lado, el extracto de *Andrographis paniculata* administrado “*in vivo*” no produjo cambios en la respuesta blastogénica de células estimuladas “*in vitro*” con ConA, al igual que en los cultivos realizados con DAP donde no se apreció un cambio en la respuesta blastogénica, incluso en presencia de ConA. En el caso de los linfocitos humanos, si bien hubo aumento en la respuesta a medida que se aumentaron las concentraciones de mitógeno, éstas no variaron cuando se cambiaron las concentraciones AP.

2. - SUMMARY

The aim to manipulate the immune response has been in the past object of many studies, but due to the complexity of the lymphoid system physiology is a goal difficult to achieve. In this work the immunomodulatory effect of andrographolide and 14 – deoxyandrographolide was studied. These active molecules were obtained from the aerial part of an Indian plant, *Andrographis paniculata* well known in the Asiatic region by its beneficial effects in infections and chronic diseases.

To study the effect of andrographolide and 14 – deoxyandrographolide in lymphocytes we used the blast transformation assay, done “*in vitro*” where human or murine lymphoid cells were cultured in absence or presence of a mitogen, in this case Concanavaline A (ConA) with or without the active molecule under investigation. In some experiments the mitogen ConA was replaced with BCG (vaccinal strain derived from *Mycobacterium bovis*).

The results show that andrographolide was able to induce an increased blast cell transformation only when was in absence of other mitogenic stimulus and at very narrow range of dose. The same dose that was able to induce and increased DNA synthetic response alone in presence of the mitogen, induced a decreased blast transformation. In the experiments where human lymphocytes when used andrographolide was unable to show an effect. Also 14 – deoxyandrographolide did not induce changes in blast transformation induced by ConA.

3. - INTRODUCCIÓN

El sistema inmune humano, y de los vertebrados en general, consiste en varios órganos y diferentes tipos de células, que le permiten al organismo distinguir lo propio y tender a eliminar lo extraño. Este mecanismo de defensa permite al individuo disponer de una barrera protectora contra agentes extraños, tales como microorganismos o productos de su catabolismo que logran ingresar al organismo. En una primera fase de la respuesta inmunitaria contra estos agentes, el antígeno activa a los linfocitos que lo reconocen específicamente; una segunda fase efectora, dichos linfocitos se encargan de organizar una respuesta inmune que debe eliminar al antígeno (Roitt *et al*, 1997).

Todos los linfocitos proceden de las células madre de la médula ósea, y se dividen en dos grupos funcionales diferentes, los **linfocitos T** que maduran en el timo y que participan en la inmunidad de tipo celular y los **linfocitos B** que maduran en la propia médula y participan en la inmunidad de tipo humoral sintetizando anticuerpos; en este último caso la célula efectora (célula plasmática) siendo la mayor productora de inmunoglobulinas (Vergara *et al*, 1998). La unión del antígeno con el receptor específico de célula T o B activa al linfocito mediante un delicado proceso bioquímico que implica transducción de señales al interior de la célula, generación de segundos mensajeros y fosforilación de proteínas.

La respuesta inmune de tipo celular cubre una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a bacterias de vida intracelular y virus, así como evitando la aparición y desarrollo de células tumorales. Sin embargo, este tipo de respuesta representa una seria limitación en la práctica de los trasplantes por ser el principal mecanismo implicado en el rechazo de los mismos. Así como es compleja en sus efectos y

acciones finales, también la respuesta inmune celular lo es en su inicio y desarrollo. Los linfocitos timo-derivados reconocen al antígeno mediante el receptor T (TCR) y lo hacen sólo cuando el antígeno ha sido degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (APC) y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de estas células en el seno de una molécula codificada en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), adicionalmente las células T también cumplen una función reguladora, mediante la cual favorecen o inhiben la respuesta inmune (Roitt *et al*, 1997). La respuesta inmune celular es fundamental en procesos infecciosos por microorganismos intracelulares, esto se confirma al observar el curso que toman las infecciones en pacientes en que la respuesta inmune celular está disminuida o no existe, un ejemplo categórico de esto último es el de los pacientes inmunodeficientes que sufren el síndrome de De-George o los infectados con VIH (Bancroft *et al*, 1991). Una respuesta inmune celular exitosa termina con la formación de células Th activas productoras de interleucinas y células citotóxicas (CTL) que poseen capacidad de lisar a las células que portan el antígeno que indujo su activación. Este tipo de respuesta requiere varios días para su desarrollo.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente se hace cada día más importante contar con los medios apropiados para aumentar la respuesta inmune, incrementando la eficiencia del sistema. El contar con un medicamento o principio activo que ayude a incrementar esta respuesta ante lo extraño, permitiría una mejor política de prevención de enfermedades infecciosas y una disminución significativa del ausentismo laboral.

En el presente trabajo nos abocamos al estudio de dos principios activos obtenidos a partir de *Andrographis paniculata*, un miembro de la familia *Acanthaceae*, arbusto anual que puede alcanzar a medir un metro de altura (Gupta *et al*, 1990), y que se ha usado durante siglos en Asia

para tratar infecciones respiratorias de las vías aéreas superiores, fiebre, herpes, y una variedad de otras enfermedades crónicas e infecciosas. Es frecuentemente citada en la Farmacopea India y usada en por lo menos 26 formulaciones, también su extracto seco de hojas y tallo son utilizados por la medicina china tradicional como un importante recurso para bajar la fiebre y en los países escandinavos, se usa normalmente para prevenir y tratar los resfríos comunes (Zhang y Tan, 1998). Los principales componentes de estos extractos son lactonas diterpénicas y sesquiterpénicas, flavonoides y azúcares. Uno de estos constituyentes es el compuesto *andrografolido*, una lactona diterpénica que se encuentra en alta concentración en *A. paniculata*, la cual es extraída de la parte aérea de la planta por medio de soluciones alcohólicas o alcalinas. A este compuesto se le atribuye la capacidad de estimular la respuesta inmune específica y no específica (Puri *et al*, 1993).

Por todo lo mencionado anteriormente se han realizado diversos estudios preclínicos y clínicos para identificar las propiedades farmacológicas de los componentes de *Andrographis paniculata*, para esto se ha utilizado tanto el extracto crudo de la planta, como el andrografolido purificado por ser este principio activo el que se encuentra en mayor concentración y al que se le atribuye el efecto beneficioso de la planta (Thamlikitukul *et al*, 1991). En estudios preclínicos, el extracto de la planta ha mostrado diversas actividades, tales como: efecto hepatoprotector administrado intraperitonealmente en ratas (Sharma *et al*, 1991), actividad antidiarreica en modelos animales tratados con enterotoxina de *Echerichia coli* (Gupta *et al*, 1990) y capacidad inmunoestimulante en ratones BALB/c (Puri *et al*, 1993), adicionalmente andrografolido ha mostrado tener una acción colerética (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 un

efecto hipotensor (Zhang *et al*, 1998) propiedades antiinflamatorias y antipiréticas (Zhang y Tan, 1998), y una moderada actividad en la diferenciación celular en ratones con leucemia mieloide (Singh *et al*, 1998). 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*, comparado con el grupo placebo (Cáceres *et al*, 1997). Adicionalmente se ha demostrado que la administración de 1.200 mg. diarios del extracto total durante cuatro días a individuos que están cursando un resfrío común, acorta los períodos de recuperación mientras es capaz de disminuir los signos y síntomas de la patología (Hancke *et al*, 1995).

En el presente estudio, se evaluó la capacidad estimulante de los principios activos en linfocitos de ratón y humanos, para esto se utilizó la técnica de transformación blástica, que consiste en un ensayo “*in vitro*” para evaluar la capacidad de respuesta de las células linfoides, y de proliferar frente a un estímulo. Esta prueba puede realizarse utilizando antígenos específicos o en su defecto, mitógenos inespecíficos que pueden activar la totalidad de las células T o B, la ventaja de estos últimos es que no requieren de una sensibilización previa de los individuos donantes de los linfocitos. Los cambios que se producen en la célula cuando ocurre esta activación, incluyen síntesis de proteínas, RNA y DNA, además de cambios morfológicos como aumento de citoplasma.

La evaluación cuantitativa de la duplicación del DNA se realizó mediante la incorporación al DNA de las células en división de timidina tritiada, por lo que la cantidad de radioactividad en las células en cultivo resulta proporcional a la frecuencia de la duplicación del material nuclear.

En base a los antecedentes mencionados se ha formulado la siguiente hipótesis de trabajo:
“Andrografolido incrementa la síntesis de DNA en células relacionadas con el Sistema Inmune, especialmente en linfocitos T”.

Como objetivo general se ha fijado:

“Demostrar que andrografolido aumenta la transformación blástica en cultivo de células provenientes de animales pre-tratados con ésta molécula o cuando se cultivan células normales en su presencia”.

Los objetivos específicos son:

- Estudiar el efecto de diferentes dosis de andrografolido en la síntesis de DNA de linfocitos esplénicos de ratones normales.
- Estudiar el efecto de diferentes dosis de andrografolido en la síntesis de DNA de ratones tratados “*in vivo*”, antes del sacrificio, con el principio activo.
- Comparar el efecto de andrografolido con el compuesto relacionado 14-deoxiandrografolido.
- Estudiar el efecto de andrografolido en linfocitos humanos.

4.- MATERIALES Y MÉTODO

4.1.- Obtención de las células.

Para este estudio se utilizaron linfocitos aislados de sangre humana obtenida de donadores voluntarios sanos y células linfoides murinas obtenidas del bazo de ratones de la cepa “Rockefeller” (RK), del vivero del Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile.

4.1.1 Linfocitos humanos.

Para obtener los linfocitos humanos la sangre fue colectada con heparina como anticoagulante, se diluyó con PBS (Merck) en una relación 1:1 y luego, con cuidado para no mezclar, se dispuso sobre una columna de Histopaque (Sigma), solución que es un polímero de carbohidratos y metrizamida (compuesto denso que contiene yodo) de una densidad de 1.077, que permite separar los linfocitos del resto de elementos figurados de la sangre. La columna así preparada se centrifugó a 1500 rpm por 20 minutos obteniéndose en la interfase un anillo que contenía los linfocitos, estos se colectaron cuidadosamente con pipeta Pasteur, se diluyeron con PBS y se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm por 10 minutos. El sedimento obtenido al final de este proceso es el que contiene los linfocitos que luego se resuspenden en RPMI 1640 completo, se cuentan en una cámara de Neubauer y su concentración se ajusta a 4×10^6 células por ml para ser sembrados luego en la placa de cultivo.

4.1.2.- Linfocitos de ratón.

Para obtener los linfocitos murinos, se utilizaron, para cada experimento, ratones de un mismo sexo y edad, los cuales fueron mantenidos en cajas a 20°C y alimentados con concentrado

para ratones y agua “*ad libitum*”. Para obtener las células murinas, los ratones fueron sacrificados por una sobredosis de éter administrada por inhalación, luego se les extrajo el bazo que se colocó en placas Petri con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 completo. Los esplenocitos se obtuvieron disgregando el órgano y la suspensión celular se puso en un tubo, allí se dejó decantar para eliminar los trozos de tejido. El sobrenadante conteniendo los linfocitos en suspensión se separó en otro tubo y de éste se tomó una alícuota de 100 µl la que se diluyó 1:9 en solución Hayem II, esta solución destruye los eritrocitos y fija a los linfocitos, luego se procedió a hacer un recuento en cámara Neubauer. Finalmente, la suspensión de linfocitos se ajustó a una concentración de 4×10^6 células por ml en RPMI 1640 completo.

4.2.- Cultivo de linfocitos humanos y de ratón.

4.2.1.-Preparación y cultivo de células.

Para preparar la placa de cultivo se utilizaron las suspensiones celulares ajustadas y suspendidas en medio completo RPMI 1640. El medio RPMI 1640 completo se denomina así cuando el medio comercial es suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Hyclone), penicilina, estreptomycin, piruvato de sodio, mercaptoetanol y anfotericina B (Sigma chemical Co, USA). De la suspensión celular antes preparada, se tomaron alícuotas de 100 µl que fueron sembradas en placas de cultivo celular de poliestireno de 96 pocillos (Falcon). Posteriormente a cada uno de los pocillos se les agregó 50 µl del mitógeno Concanavalina A (ConA, Sigma) y 50 µl de los principios activos en estudio a diferentes concentraciones, según corresponda en cada experimento, manteniendo siempre pocillos como control que recibieron además de las células, RPMI 1640 sólo o conteniendo la misma cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) que

sirvió como vehículo para los principios activos en estudio. Es importante señalar que toda esta preparación se realizó bajo una cámara de flujo laminar (Heraeus Lamin Air TL 2448) para evitar la contaminación de los cultivos. Finalizada su preparación la placa de cultivo se incubó en estufa (Heraeus) por 48 horas a 37°C con un 5% de CO₂, que son las mejores condiciones para la proliferación celular.

4.2.2.- Evaluación de la respuesta blastogénica.

Para evaluar la respuesta blastogénica de los linfocitos frente a antígenos o mitógenos incluidos en el cultivo, las placas después de ser incubadas por 48 horas en estufa a 37°C con un 5% de CO₂, recibieron en cada pocillo 25 µl de medio de cultivo que contenía 0,5 µCi de timidina-tritiada (ThyH³, Amersham Biosciences, UK), las placas se cultivaron por 24 horas más bajo las mismas condiciones, para luego proceder a su cosecha mediante un cosechador celular (Multimash 2000 Dynatech) mediante el cual, los linfocitos se depositan automáticamente en un filtro de lana de vidrio y son lavados para eliminar la ThyH³ que no fue incorporada en las células. Posteriormente estos filtros se secaron en estufa por un mínimo de 12 horas, transcurrido este tiempo cada uno de estos filtros fue colocado en viales de centelleo con 6 ml de solución de centelleo o Ecoscint (Fermelobiotec) para finalmente ser llevados a un contador de centelleo donde la ThyH³ incorporada al cultivo fue medida y expresada como cuentas por minuto (CPM). Los resultados fueron expresados como el promedio de los CPM obtenidos de los cultivos hechos por triplicado bajo las mismas condiciones experimentales o mediante el cálculo del índice de estimulación (IE) el cual se obtiene de la razón entre las CPM del cultivo experimental dividido por las CPM de los cultivos considerados en cada experimento como control. Los gráficos de

barra con sus respectivas desviaciones estándar fueron realizados con el programa GRAPH PAD PRISM 3.0

4.3.- Antígeno, mitógeno y principios activos usados en los cultivos celulares.

Como antígeno, en ensayos realizados con linfocitos humanos, se utilizó la cepa vaccinal de *Mycobacterium bovis* Calmette - Gerin (BCG) a una concentración de 1×10^6 células por ml. Para la estimulación “*in vitro*” de los linfocitos de ratón en cultivo se utilizó el mitógeno Concanavalina A en concentraciones de 0.5, 1.7 y 5.0 $\mu\text{g/ml}$.

Los principios activos andrografolido (AP) y 14-deoxiandrografolido (DAP), que se obtienen a partir de *Andrographis paniculata*, fueron adquiridos en el Laboratorio Amsar Private Ltda., India. Ambos fueron utilizados en cultivos de células de bazo de ratón y linfocitos humanos, en concentraciones de 5.0, 0.5 y 0.05 nM. disuelto en DMSO al 0.0001 % y diluidos en medio completo RPMI 1640. También se realizó un ensayo donde los animales fueron inyectados antes de su sacrificio, durante seis días por vía intraperitoneal con extracto seco total de *Andrographis paniculata* que contenía $6,11 \pm 0,28$ % p/p de andrografolido (Swedish Herbal Institute, Suecia), para estos ensayos se utilizaron concentraciones de 30, 3 y 0,3 mg/kg diluido en etanol al 0.08 %.

5.-RESULTADOS

5.1.- Efecto de Andrografolido en la estimulación “*in vitro*” de linfocitos de ratón estimulados o no con ConA.

Para este ensayo se utilizó una suspensión de células esplénicas provenientes de ratones de la cepa Rockefeller sin tratamiento previo, las células fueron cultivadas en presencia de distintas concentraciones de ConA y distintas concentraciones de AP, usando como control cultivos con sólo RPMI o RPMI adicionado con la dosis de DMSO que llevaba el principio activo. En la Figura 1 puede verse que ConA, como era de esperar, aumenta la síntesis de DNA en directa proporción con las dosis utilizadas, llama la atención que AP a la dosis de 0.5 nM aumenta la síntesis de DNA en los cultivos controles efectuados en ausencia de ConA, mientras que la disminuye en los cultivos efectuados en presencia del mitógeno ConA.

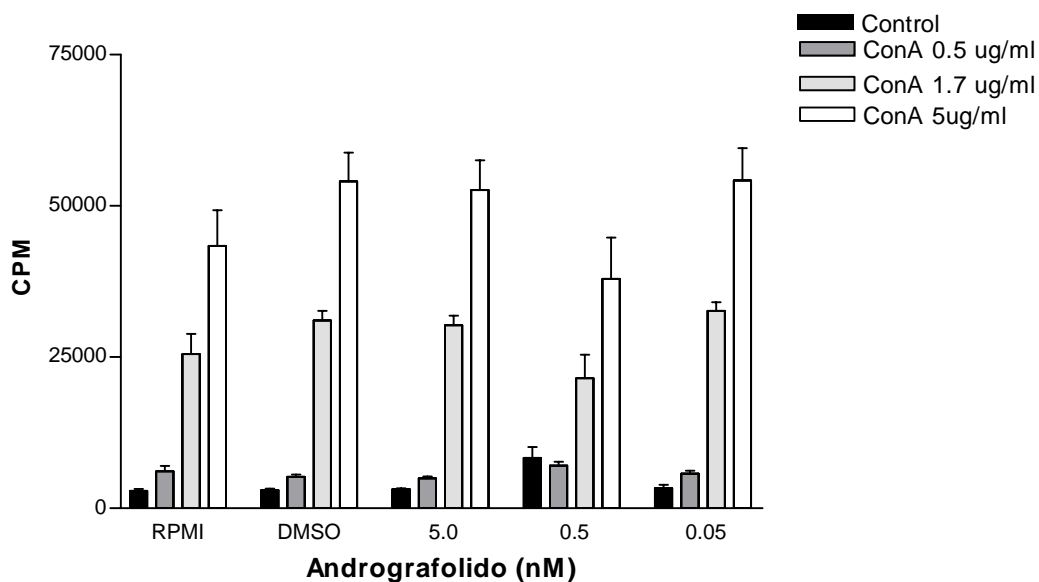


Figura 1: Incorporación de ThyH³ en linfocitos de bazo de ratón RK, cultivados con andrografolido y estimulados con ConA en concentraciones crecientes y mantenidos “in vitro” por 72 horas. En el gráfico cada una de las barras representa el resultado promedio de un total de tres experimentos, cada uno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

Con el fin de poner mejor en evidencia el efecto estimulante de AP en los cultivos en ausencia de ConA y su efecto contrario cuando el mitógeno estaba presente, se calculó el IE, que como se explicó en la sección de materiales y método, es la razón entre el valor de las CPM de los distintos cultivos expuestos y los cultivos controles hechos en ausencia de ConA y/o AP. Como puede verse en la Figura 2, AP estimula las células cultivadas en ausencia de ConA sólo a una concentración de 0.5 nM, en este caso el IE fue cercano a 3.

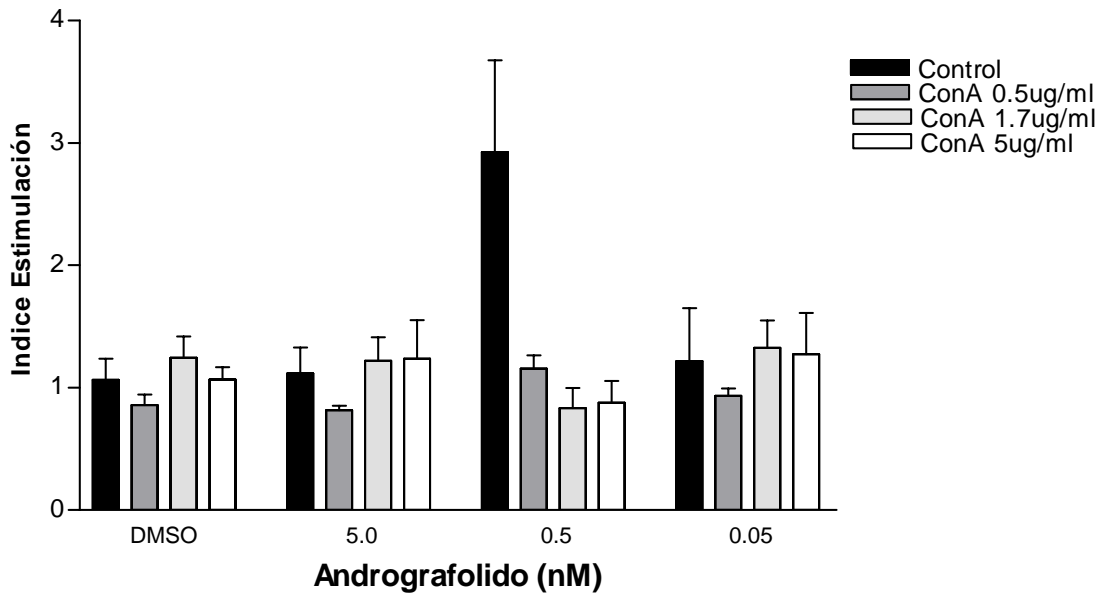


Figura 2: Índice de estimulación calculado a partir del promedio de tres ensayos realizados “in vitro” con linfocitos de ratón en presencia de distintas concentraciones de andrografolido y el mitógeno ConA, con respecto al grupo control que contenía sólo RPMI.

En la posibilidad que el efecto de AP descrito en células linfoides sin estimulación adicional, se debiera al DMSO que contenía el vehículo del principio activo, se calculó igual que en el punto anterior el IE, usando como control los cultivos que tenían sólo el diluyente de AP.

Como puede verse en la Figura 3, los resultados son comparables con los presentados en la Figura 2, por lo que puede concluirse que DMSO a las concentraciones usadas no produce estimulación.

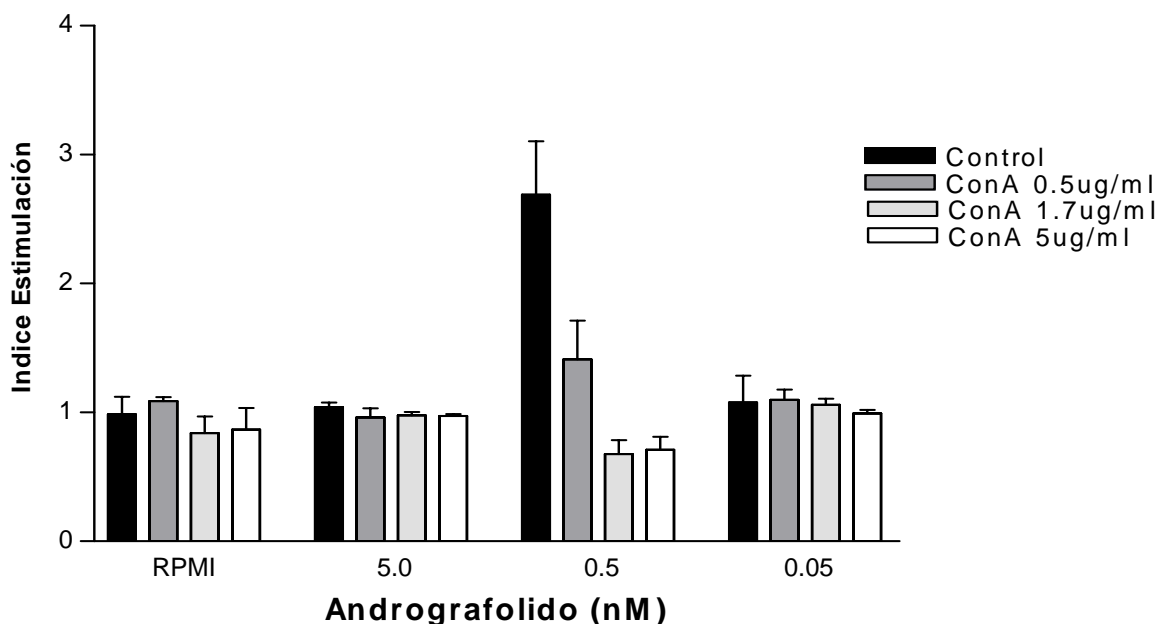


Figura 3: Índice de estimulación calculado a partir del promedio de tres ensayos realizados “in vitro” en presencia de distintas concentraciones de andrografolido y en presencia de mitógeno ConA, con respecto al grupo control que contenía el diluyente DMSO.

Hasta ahora podíamos concluir que AP sólo afecta positivamente a las células en cultivo que están en ausencia del mitógeno ConA. Para asegurar este punto se procedió a calcular el índice de estimulación “intragrupo”, es decir, la razón de los resultados de los cultivos incubados con distintas dosis de ConA y los cultivos controles del mismo grupo, todos incubados en presencia de una misma dosis de AP.

Como puede verse en la Figura 4 el IE intragrupo que se obtiene en los cultivos que estuvieron en presencia de 0.5 nM de AP, fue el único que se muestra disminuido frente a las demás condiciones experimentales usadas.

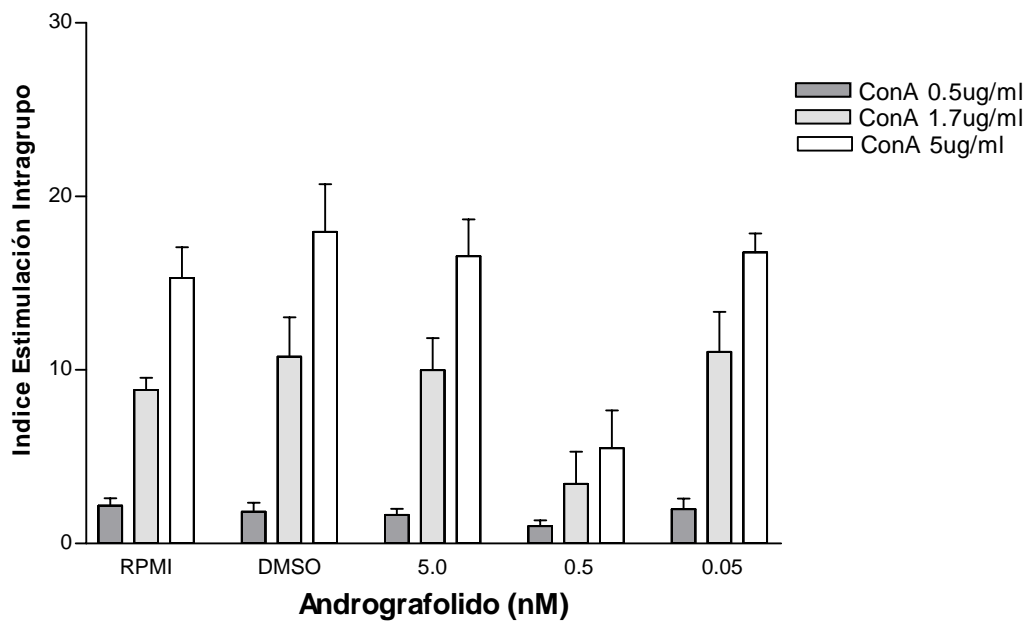


Figura 4: Índice de estimulación “intragrupo” obtenido a partir de la razón de los resultados de los cultivos incubados con ConA y los cultivos controles en presencia todos de una misma dosis de andrografolido.

5.2.- Estudio del rango de dosis en que andrografolido estimula “*in vitro*” la síntesis de DNA en linfocitos de ratón.

Con el fin de estudiar la capacidad estimuladora de AP en ausencia de mitógeno, se estableció un rango más amplio de concentraciones del principio activo para poder determinar el rango de dosis en que se evidencia su máxima capacidad estimuladora. Para ello se utilizaron concentraciones de principio activo que van desde 0.02 nM hasta 5.0 nM. En la Figura 5 se puede observar que cuando las células se cultivan sin mitógeno en presencia de las distintas concentraciones de AP se ve un aumento máximo de la síntesis de DNA a la concentración de 0.5 nM, esto se pone en evidencia cuando se ven las cuentas por minuto o cuando se hace el cálculo del IE visualizado en la Figura 6. Esto es absolutamente comparable con los ensayos anteriores donde la mayor incorporación de ThyH³ resultó ser a esta concentración de AP.

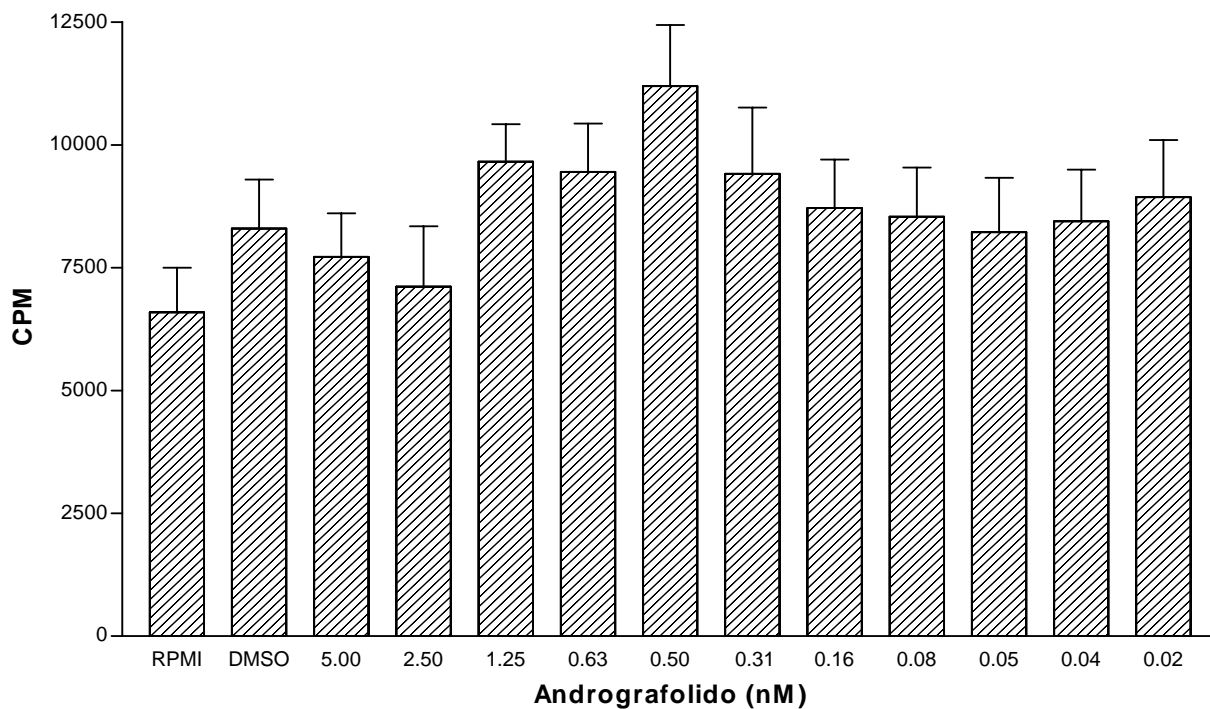


Figura 5: Promedio de la incorporación de ThyH³ medida como CPM en tres ensayos realizados cada uno por triplicado, de células linfoides de ratón cultivadas en presencia de distintas concentraciones del principio activo y en ausencia de mitógeno.

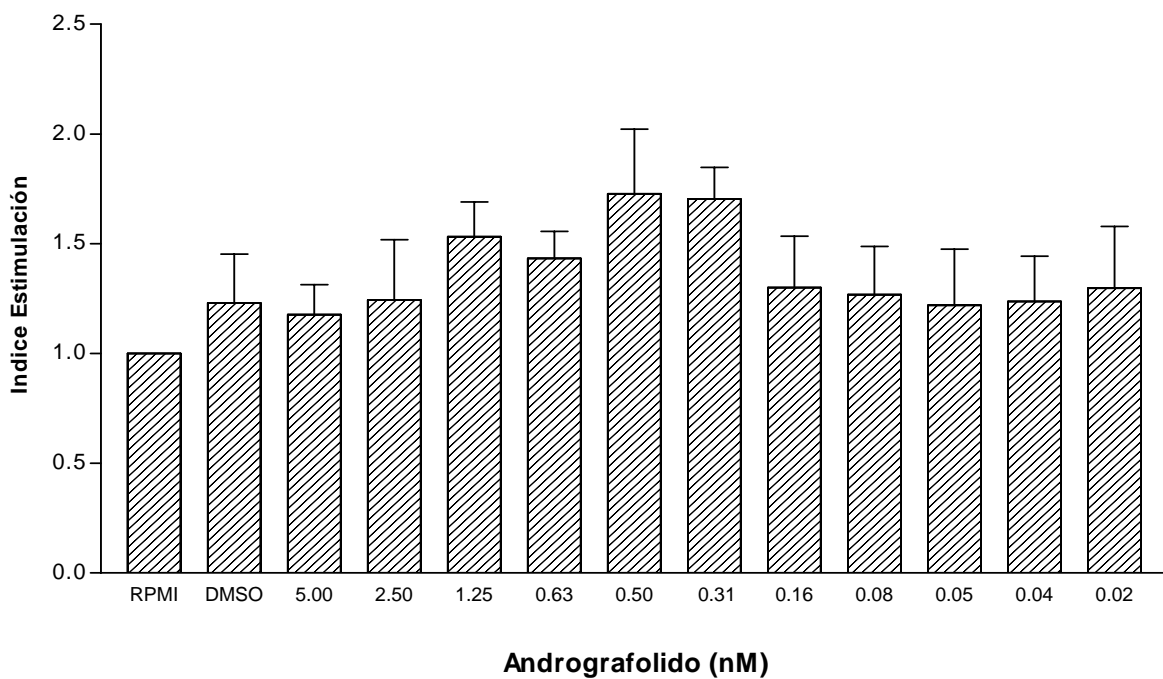


Figura 6: Índice de estimulación obtenido a partir de tres ensayos realizados en linfocitos murinos bajo las mismas condiciones experimentales, con un rango de concentraciones de principio activo en ausencia de mitógeno y calculado en base al grupo control tratado sólo con RPMI.

5.3.- Estudio del efecto de 14 - deoxiandrografolido en la síntesis de DNA de linfocitos esplénicos de ratones normales.

Adicionalmente, en esta serie experimental se estudió el efecto de un segundo compuesto presente en *Andrographis paniculata*, el 14 – deoxiandrografolido (DAP) en la síntesis de DNA de linfocitos de ratón, utilizando el método de transformación blástica de la misma manera que en los ensayos anteriores. Para esto las suspensiones celulares de linfocitos, obtenidos del bazo de los animales de experimentación, se cultivaron por 48 horas en presencia del principio activo y fueron estimuladas o no con el mitógeno ConA en concentraciones crecientes. Al evaluar la respuesta blastogénica, como puede verse en la Figura 7, DAP no produce cambios en la síntesis de DNA a las concentraciones utilizadas. Al igual que en los puntos anteriores, se calculó el IE con respecto al grupo control tratado sólo con RPMI, con la finalidad de poder visualizar mejor algún efecto del principio activo, como se muestra en la Figura 8, se corrobora que DAP no produjo variaciones en la incorporación de ThyH³. De la misma manera como se realizó con AP, se calculó el IE con respecto al diluyente DMSO, como se muestra en la Figura 9, este solvente no ejerce ningún efecto sobre las células en cultivo en las concentraciones utilizadas.

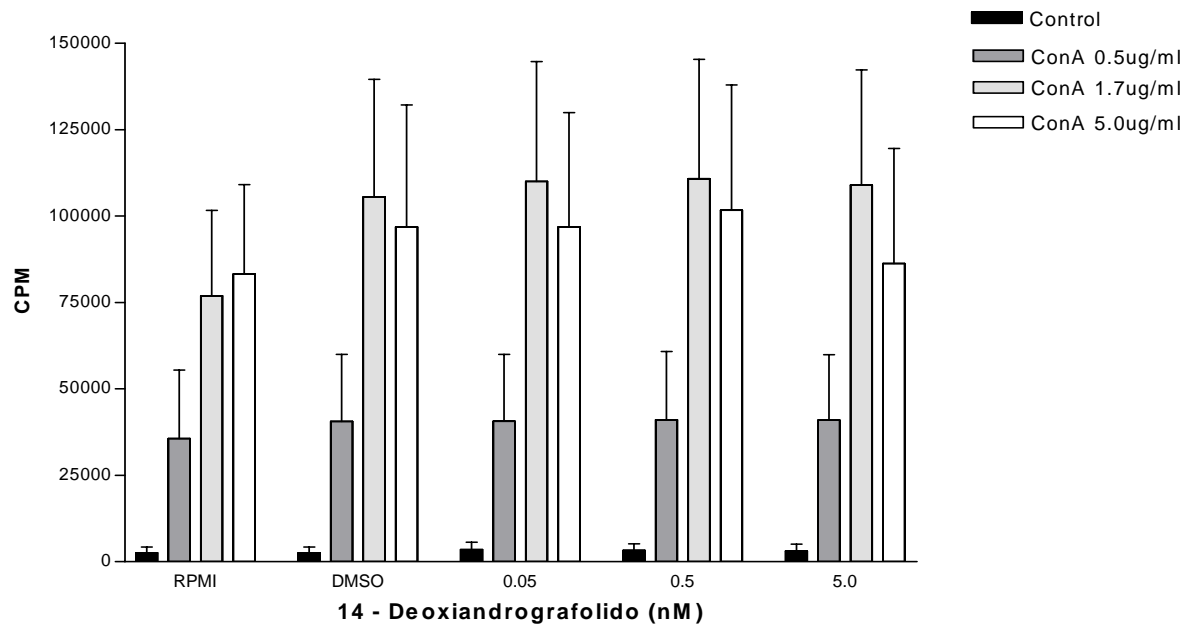


Figura 7: Promedio de seis ensayos realizado con linfocitos murinos, cada uno por triplicado, con distintas concentraciones de DAP y en presencia de mitógeno ConA. Las barras representan la incorporación de ThyH³ expresado como CPM.

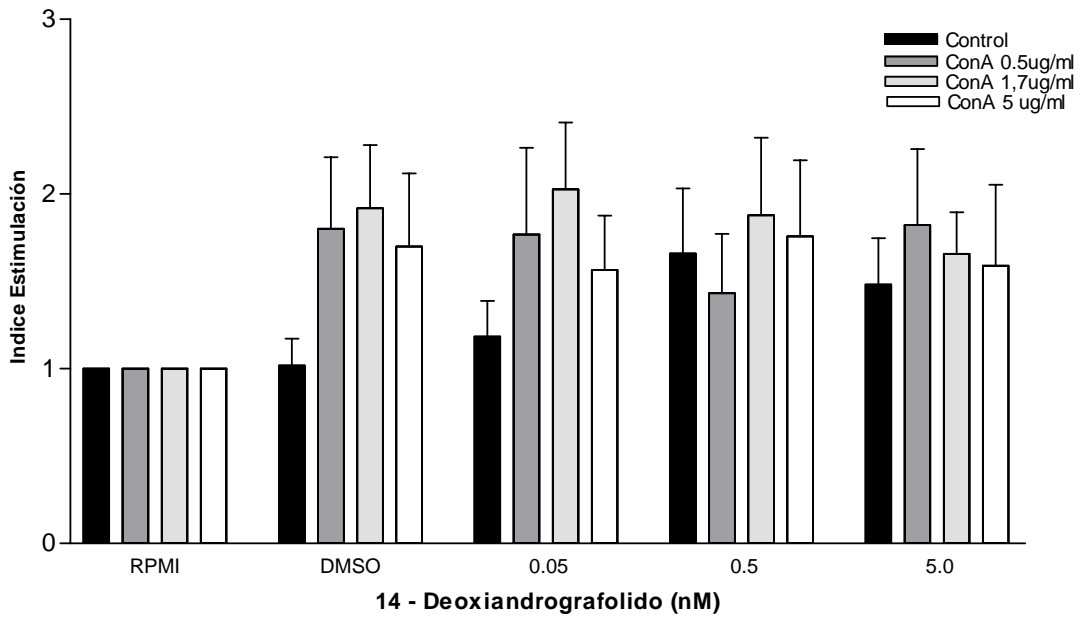


Figura 8: Índice de estimulación calculado con respecto al medio de cultivo RPMI en seis ensayos realizados con linfocitos murinos, con diferentes concentraciones de DAP y en presencia de ConA.

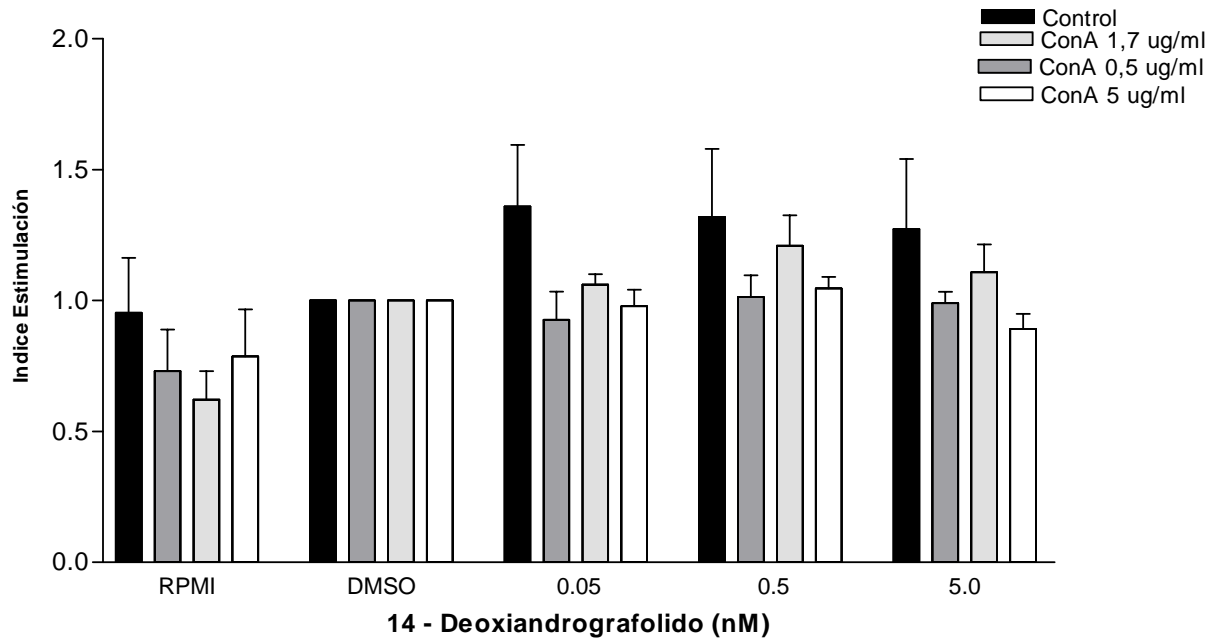
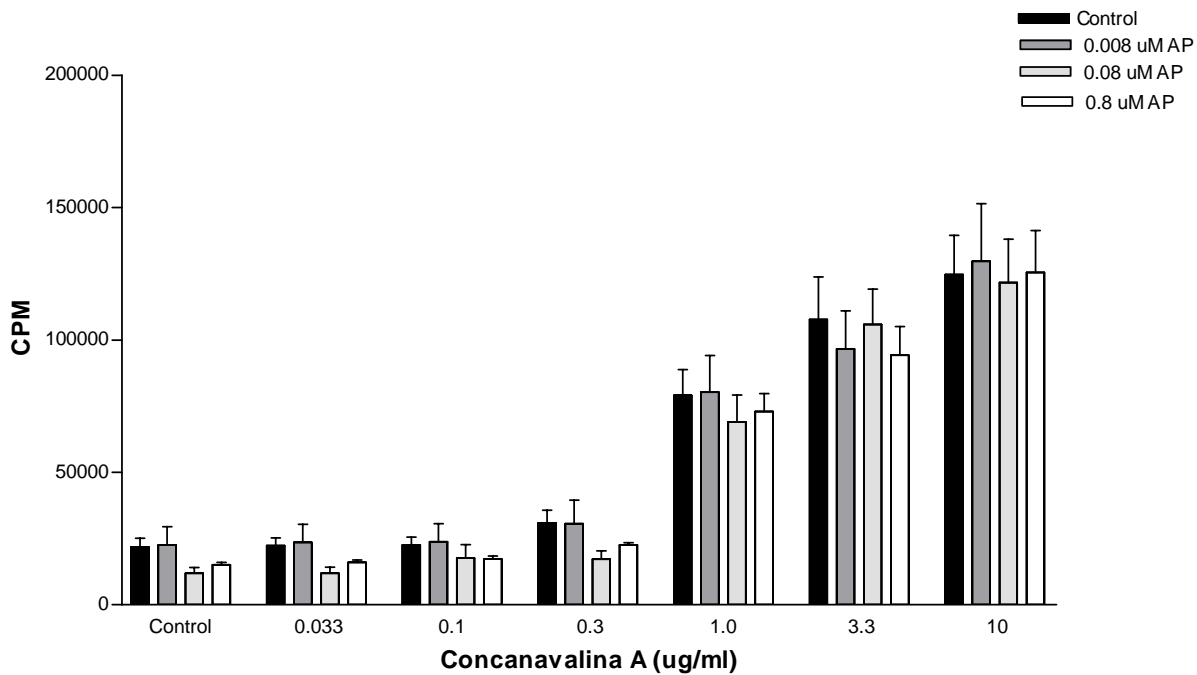


Figura 9: Gráfico muestra el índice de estimulación calculado con respecto a los cultivos control de linfocitos murinos realizados con el diluyente DMSO, en presencia de diferentes concentraciones de DAP y mitógeno ConA.

5.4.- Estudio de la síntesis de DNA en linfocitos esplénicos provenientes de ratones tratados previamente con extracto de *Andrographis paniculata*.

Para esta parte del estudio se evaluó la síntesis de DNA en cuatro grupos de ratones que fueron tratados previamente con inyecciones por vía intraperitoneal durante seis días con dosis de 0,3; 3,0 y 30,0 mg/kg del extracto seco de *Andrographis paniculata* que contenía un 6,11 % de andrografolido, por lo que se puede inferir que la concentración de principio activo AP administrado a cada grupo de ratones fue de 0,008; 0,080 y 0,800 μM , respectivamente. Estos resultados fueron comparados con los de un grupo control al que se les administró una solución que contenía etanol a la misma concentración usada para diluir el extracto. Transcurrido estos seis días, los ratones fueron sacrificados obteniéndose de ellos el bazo para realizar los cultivos celulares de la manera que se explicó anteriormente. Los resultados que se muestran a continuación representan el promedio de los datos obtenidos en cuatro ensayos realizados en diferentes fechas y bajo las mismas condiciones experimentales. En la Figura 10 se aprecia que si bien la respuesta blastogénica aumenta a medida que aumentan las dosis de ConA en cultivo, esta respuesta no se ve afectada con las distintas dosis del extracto usadas como pretratamiento en los animales vivos. Al igual que en los ensayos anteriores, en base a estos mismos resultados, se procedió a calcular el IE que como puede verse en la Figura 11, demuestran el nulo efecto del pretratamiento de los ratones con *Andrographis paniculata* en la respuesta de sus linfocitos al mitógeno ConA.



*Figura 10: Gráfico mostrando el promedio de cuatro ensayos realizados con células de ratones tratados “in vivo” con inyecciones intraperitoneales de extracto seco de *Andrographis paniculata* y estimuladas “in vitro” con concentraciones crecientes de mitógeno ConA. Cada barra representa el promedio arrojado por los cuatro experimentos con su respectiva desviación estándar.*

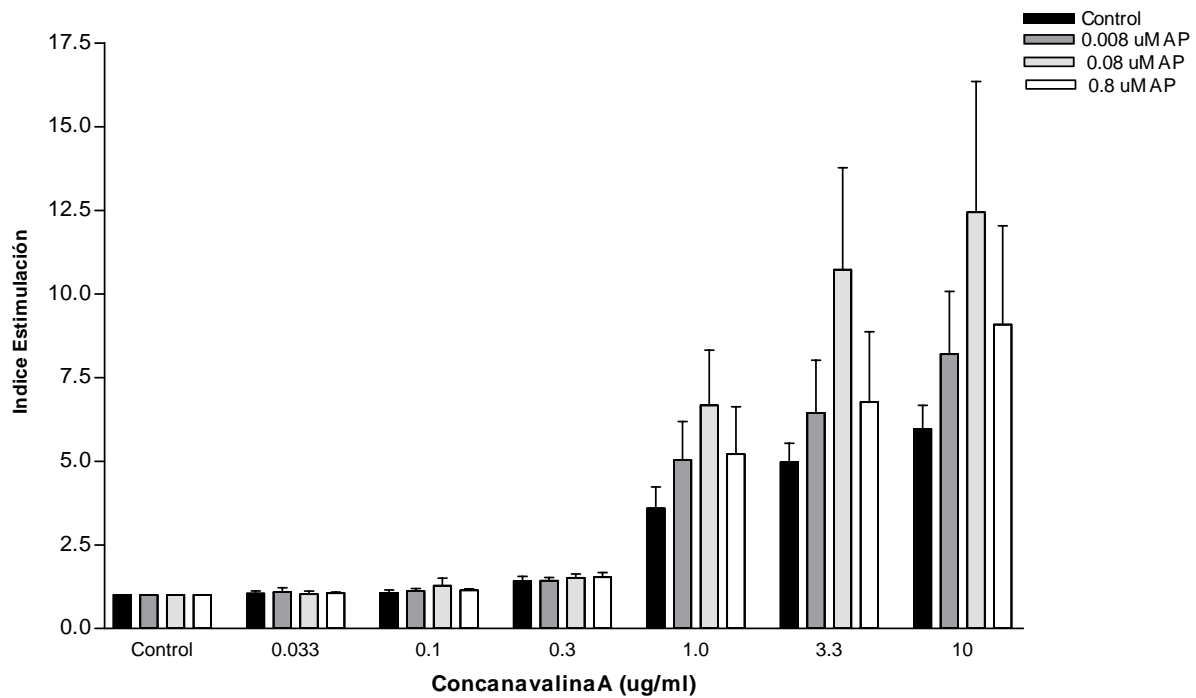


Figura 11: Índice de estimulación de los ensayos realizados con células de ratones, basado en los resultados obtenidos del ensayo “in vivo” con el extracto seco de Andrographis paniculata, calculado como la razón de las CPM de los cultivos en presencia de andrografolido dividido por aquellos efectuados como control, sólo con etanol al 0.08 %.

5.5.- Estudio de la síntesis de DNA en linfocitos humanos incubados “*in vitro*” con el mitógeno ConA y con *Mycobacterium* como antígeno.

A continuación se muestran algunos ensayos realizados con linfocitos humanos obtenidos a partir de dadores voluntarios sanos y aislados de la manera que se explica en la sección de materiales y método, con la finalidad de observar el efecto de AP sobre la síntesis de DNA humano “*in vitro*”. Como estimulante inespecífico se usó en la presente serie experimental, tal como en los ensayos previos, ConA y como antígeno la cepa vaccinal de *Mycobacterium* BCG, atendiendo a que hoy día podría decirse que el cien por ciento de los individuos en nuestro país está vacunado contra este patógeno.

Una vez obtenidas las células linfoides de dos donantes voluntarios, estas fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de ConA que van desde 0.01 a 3.0 µg/ml, cada una de las muestras se realizó por cuadruplicado y los resultados obtenidos podemos observarlos en la Figura 12, en que se aprecia que si bien hay aumento en la respuesta a medida que aumentan las concentraciones de mitógeno, éstas no varían cuando se cambian las concentraciones del principio activo.

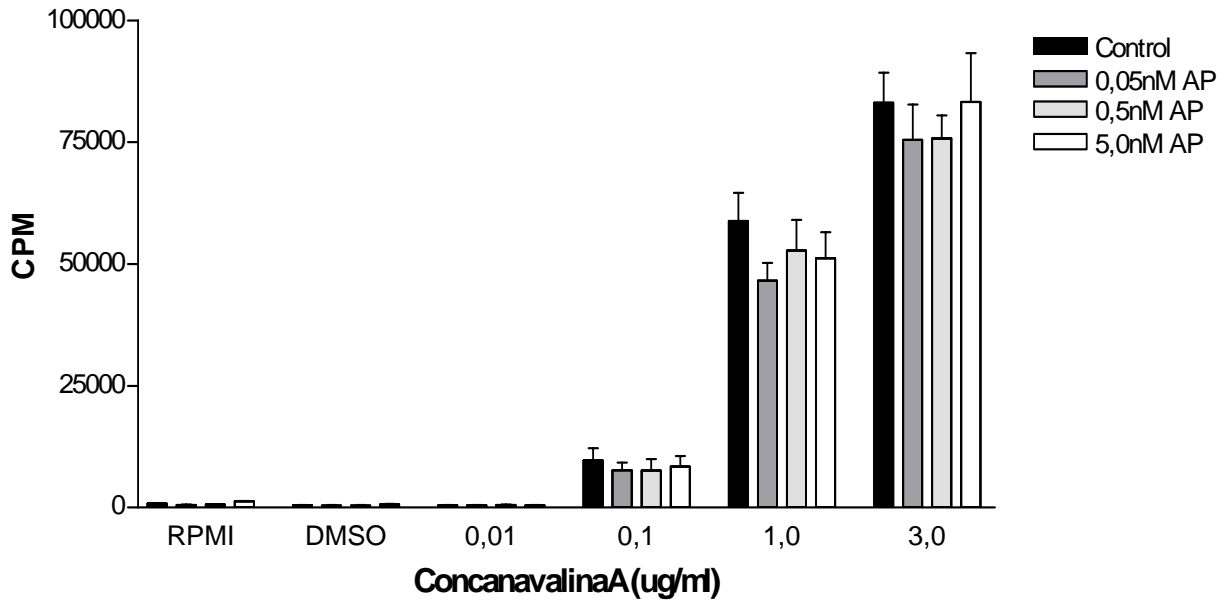


Figura 12: Gráfico promedio de la incorporación de ThyH³ expresada en CPM, realizada con linfocitos humanos de dos donantes, que fueron estimulados con distintas concentraciones de ConA y Andrografolido.

En un segundo ensayo de esta serie, se tomaron linfocitos de cuatro voluntarios, con diferentes dosis de AP y 10^6 células de *Mycobacterium* por ml, asumiendo que las células linfoides de estos voluntarios, dada su vacunación previa, debían reaccionar frente a esta vacuna. La respuesta a los antígenos bacterianos antes nombrados se pueden ver en la Figura 13, acá al igual que en el ensayo anterior AP no muestra efecto en la incorporación de ThyH³.

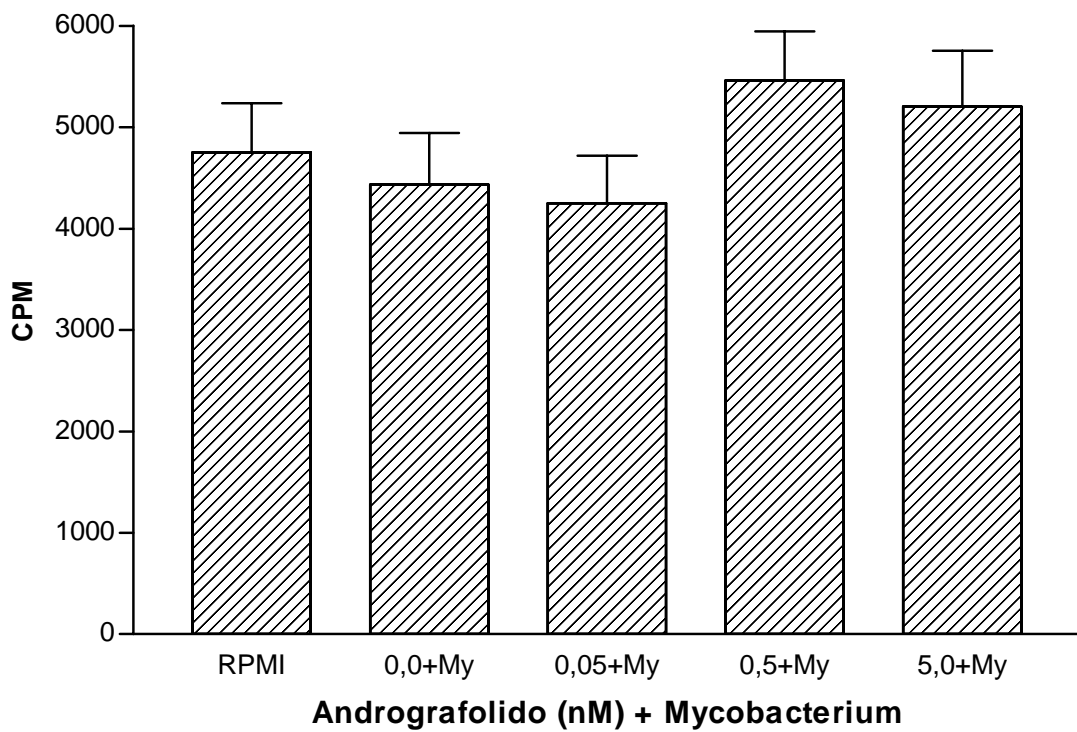


Figura 13: Gráfico representa el promedio de cuatro ensayos realizados con linfocitos humanos cultivados con diferentes dosis de Andrografolido y vacuna de Mycobacterium a una concentración de 1×10^6 /ml.

6.- DISCUSIÓN

Se sabe que el extracto de *Andrographis paniculata* y sus respectivos principios activos tienen propiedades estimulantes de la respuesta inmune, tanto en animales de experimentación como en humanos por los estudios clínicos que se conocen, disminuyendo síntomas y acortando períodos de resfrío común (Hancke *et al*, 1995; Melchior *et al*, 1996/97; Cáceres *et al*, 1997; Cáceres *et al*, 1999). Partiendo de la base que el extracto total de este vegetal aumenta la resistencia inmunológica como se ha dicho anteriormente, podría esperarse que sus principios activos, a los que se atribuye esta inmunopotenciación (AP y DAP), actúen en forma sinérgica con estimulantes “*in vitro*” de las células linfoides, más específicamente con los linfocitos T, que como sabemos son estimulados policlonalmente con el mitógeno ConA. Este efecto no pudo ser demostrado, muy por el contrario AP, a las concentraciones usadas disminuye la respuesta a ConA en linfocitos de ratones. En estos ensayos llamó la atención que en una concentración muy estrecha de dosis, AP fue capaz de estimular la blastogénesis de linfocitos en cultivo o de actuar en forma antagónica a la actividad mitogénica de ConA. Resulta importante destacar acá que AP en estos ensayos ha actuado como un verdadero “inmunomodulador” que en ausencia de estímulos adicionales es capaz de aumentar la mitosis basal, ocasionando el efecto contrario cuando la misma dosis es administrada a las células T activadas en forma enérgica por el mitógeno policlonal usado en estos ensayos.

Con respecto a DAP debemos decir que aunque ha sido menos estudiado que AP, debido a que no se le conocen efectos que alteren significativamente la fisiología del sistema inmune (Seguel, 2004), mediante los ensayos acá realizados, se ha demostrado que en las condiciones

experimentales usadas carece de efectos directos en linfocitos cultivados “*in vitro*” ya sea sólo o en presencia de ConA. Igualmente resultaron negativos los ensayos en que el extracto total de *Andrographis paniculata* fue inyectado diariamente por una semana a ratones de experimentación, no pudiendo en este caso, poner en evidencia un aumento de la síntesis de DNA en cultivos estimulados con ConA. Un esquema experimental semejante fue probado anteriormente en este laboratorio, lográndose potenciar la respuesta a la vacuna para la *Brucella* RB-51. Es importante destacar que en estos ensayos AP potenció la respuesta celular ya que cuando los ratones vacunados con *B. abortus* RB-51 eran previamente tratados con AP, mostrando un aumento en la capacidad de sus células para sintetizar DNA “*in vitro*” como respuesta al inmunógeno y un incremento en la síntesis de citoquinas Th-1 como IFN- γ e IL-2, por el contrario, estos mismos animales no mostraron variación en la producción de citoquinas Th-2 como IL-4 e IL-5 y los títulos de anticuerpo se mantuvieron sin variaciones con respecto del control (Martínez, 2003). Estos hallazgos permitieron suponer que AP pudiera actuar en forma sinérgica con ConA “*in vitro*” o aumentando la respuesta contra este mitógeno cuando AP se inyecta previo a la obtención de las células, cosa que como sabemos no ocurrió.

Con respecto a los linfocitos humanos, para las dos condiciones que se probaron: respuesta blastogénica a ConA y respuesta a *Mycobacterium*, AP en cultivo no produjo efecto, como sabemos cerca del cien por ciento de los individuos del país están vacunados contra *Mycobacterium tuberculosis*, por tanto, era de suponer que existiría una respuesta contra este microorganismo, por lo que a la luz de los ensayos hechos anteriormente con la vacuna para *Brucella abortus*, podría esperarse una respuesta anti *Mycobacterium* potenciada por AP, esto no ocurrió, una causa probable de esto es que en los ensayos anteriores hechos en ratones, el extracto

de *Andrographis paniculata* fue inyectado inmediatamente antes de la inmunización, en el caso presente individuos inmunes por largo tiempo fueron expuestos al antígeno y al estimulante AP “*in vitro*”, en este caso el principio activo principal de *Andrographis paniculata* no generó cambios en la cuantía de la síntesis de DNA.

7.- BIBLIOGRAFIA

1. Bancroft, GJ., Schreiber, RD., Unanue, ER. (1991) Natural immunity: a T cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the *scid* mouse. *Immunol Rev*; 124: 5-24.
2. Burgos, R., Hancke, J. Pharmacology of *Andrographis paniculata*. Review Instituto de Farmacología, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
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. Chang, S., Ding, L., Gai-qing, C., Qi-choa, P., Ze-lin, Z., Smith, K. (1991) Dehydroandrographolide succinic acid monoester as an inhibitor against the human immunodeficiency virus. *P.S.E.B.M*, 197, 59- 66.
6. Cui, L., Qiu, F., Wang, N., Yao, X. (2004) Four new Andrographolide metabolites in human urine. *Chem. Pharm. Bull*, 52(6) 772-775.
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. *Immunology 2004*. MEDIMOND Italia, 353 - 357.

8. 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.
9. 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.
10. Iruretagoyena, M., Tobar, J., Gonzalez, P., Sepúlveda, S., Figueroa, C., Burgos, R., Hancke, J., Kalergis, A. (2004) Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *JPET*, 72512.
11. 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.
12. Koteswara Rao, Y., Vimalamma, G., Venkata Rao, C., Tzeng, Y. (2004) Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*, 65, 2317-2321.
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. 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.

16. 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.
17. 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.
18. Roitt, I., Brostoff, J. y Mele, D. (1997). *Inmunología* (4ª Ed.) Harcourt Brace, España.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Tripathi, G. S. and Tripathi, Y. B. (1991) Choleric action of andrographolide obtained from *Andrographis paniculata* in rats. *Phytother. Res.*, 5, 176 – 178.

23. 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.
24. 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
25. 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.

ANEXOS

1. - MEDIO COMPLETO RPMI 1640

Para preparar 100ml de solución:

1ml piruvato de sodio 100x estéril

1ml penicilina – estreptomicina 100x estéril

1ml anfotericina B 100x estéril

1ml 2-mercaptoetanol 100x estéril

10ml suero bovino fetal (SBF) estéril

86 ml RPMI 1640 incompleto estéril

Esta solución debe ser mantenida entre 2 y 8 °C y puede almacenarse hasta seis semanas después de la preparación.

2. - BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) Ph 7.0

Para preparar 1000 ml de solución:

NaCl 80,0 grs.

Na₂HPO₄ 11,6 grs.

KH₂PO₄ 2,0 grs.

KCl 2,0 grs.

H₂O c.s.p. 1000 ml.

Para ajustar pH se utiliza NaOH 5M o HCl 2N, se debe guardar a 4°C por un máximo de tres días después de su preparación.