

Actividad de infusiones de plantas comerciales de uso medicinal sobre el sistema de complemento de conejo

Castro, Juan F.¹; Nora B. Muruaga²

¹ Instituto de Fisiología Animal.

² Herbario Fanerogámico.

Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) Tucumán, tel. (0381) 433 0516.

Autor correspondiente: felipecastrobiologo@gmail.com

► **Resumen** — Castro, Juan F.; Nora B. Muruaga. 2015. "Actividad de infusiones de plantas comerciales de uso medicinal sobre el sistema de complemento de conejo". *Lilloa* 52 (2). El complemento es un componente de la inmunidad de muchos organismos y con diferentes vías de activación. El objetivo de este trabajo fue comprobar el efecto de plantas comerciales de uso medicinal sobre la actividad *in vitro* del sistema de complemento de suero de conejo inmunizado con eritrocitos de otra especie de mamífero. De un total de 26 plantas analizadas, 13 mostraron un efecto claramente inhibitorio del sistema de complemento, 2 no tuvieron diferencia con el control y 11 mostraron un efecto amplificador de la actividad del sistema del complemento. El tratamiento con calor del suero inmune de conejo inhibe la actividad del complemento sin afectar la actividad aglutinante sobre los glóbulos rojos incluso en una dilución de 1/64, lo que indica la presencia de anticuerpos anti-glóbulos rojos humanos

Palabras clave: Complemento; Conejo; Hierbas; Inmune; Medicinal.

► **Abstract** — Castro, Juan F.; Nora B. Muruaga. 2015. "Activity of the medicinal commercial herb infusions on the rabbit complement system". *Lilloa* 52 (2). Complement is a component of the immunity of many organisms and with different activation pathways. The aim of this paper was to test the effect of medicinal herbs on *in vitro* activity of complement system of rabbit serum immunized with erythrocytes from other mammalian species. Of 26 herbs analyzed, 13 showed a inhibitory effect, 2 showed no difference with control, and 11 showed an amplifying effect of hemolytic activity of complement system. Immune rabbit serum heating was inhibitor of complement activity but was not able to affect the binding of red blood cells even at dilution of 1/64, indicating the presence of antibodies anti-human red blood cells.

Keywords: Complements; Herbs; Immune; Medicinal; Rabbit.

INTRODUCCIÓN

El sistema de complemento forma parte de los mecanismos de defensa de los vertebrados contra diferentes organismos patógenos. Éste sistema está formado por una cascada enzimática que tiene como finalidad la destrucción de microorganismos. La mayor parte de los componentes de sistema de complemento son proteínas plasmáticas y sólo una parte son proteínas de membranas (Regueiro y López Larrea, 1998). Para llevar a cabo su actividad lítica, el complemento debe activarse lo cual se efectúa mediante

tres procesos inicialmente distintos: la vía clásica, la vía alterna y la vía de las lectinas. La vía clásica de activación requiere la unión del antígeno al anticuerpo. El anticuerpo generalmente es una inmunoglobulina de tipo M o G, que al unirse al antígeno provoca la activación del componente C1 de este sistema. La vía alterna no necesita la unión antígeno-anticuerpo para activarse. En este caso el factor C3 se une al antígeno y se produce la activación de la cascada. La vía de las lectinas se activa, como la vía clásica a partir del C1, pero uniéndose a lectinas y no a anticuerpos. Las tres vías convergen en el complejo de ataque de membrana, que es un conjunto proteico que tiene como finalidad

producir la muerte celular del microorganismo. La activación por la vía clásica es la más común en los mamíferos e implica la exposición previa a los antígenos del organismo patógeno y la generación de anticuerpos específicos contra éste (Regueiro y López Larrea, 1998). En los vertebrados poiquilothermos se ha observado la activación de la vía alterna, por contacto con células extrañas (Yamada y Kiyohara, 1999). Ello se ha descrito en peces (Suner y Tort, 1994), anfibios (Fernández, 1986), y en reptiles (Fernández y Saad de Schoos, 1990). En nuestro laboratorio hemos comprobado la actividad lítica espontánea contra eritrocitos de mamíferos por parte de la vía alterna del sistema del complemento de tortuga (Castro y Fernández, 2009).

Las plantas medicinales son usadas desde tiempos ancestrales en diferentes pueblos en el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias. Su aplicación es variada y su aporte a la farmacología y a la medicina es verdaderamente importante (Alonso, 2007; Makrides, 1998; Molaes y Ladio, 2009; Ndhala *et al.*, 2009; Sadr Lahijani *et al.*, 2006; Tsirkin, 1985). La relación entre los efectos farmacológicos de las plantas medicinales y los procesos fisiológicos subyacentes es un campo de investigación muy activo porque permite comprender los fundamentos de su funcionamiento a nivel celular y molecular.

El objetivo de este trabajo fue comprobar el efecto de plantas comerciales de uso medicinal sobre la actividad *in vitro* del sistema de complemento de suero de conejo inmunizado con eritrocitos de otra especie de mamífero.

MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los casos en los ensayos de este trabajo se realizaron por triplicado.

Se realizaron los correspondientes controles para asegurar que el suero de conejo no inmunizado no lisa los eritrocitos humanos.

Buffers utilizados.— PBS (buffer fosfato salino): NaCl 6,8 g/l; Na₂HPO₄ 1,4 g/l; KH₂PO₄

0,43 g/l. Buffer complemento: Na Cl 140 mM, Tris (trihidroximetilaminometano) 10 mM, Ca Cl₂ 0,1 mM, Mg Cl₂ 0,1 mM. Buffer EDTA: Na Cl 140 mM, Tris 10 mM, EDTA (etilendiamino-tetraacético) 5 mM.

Suero inmune de conejo.— Se usaron conejos adultos *Oryctolagus cuniculus* L. (Leporidae – Lagomorpha) criados en el laboratorio. Estos fueron inoculados con una suspensión al 50% de glóbulos rojos humanos con adyuvante de Freud's completo (ACF) (Sigma Inc.) en la parte dorsal de los animales. Una semana después de la primera inmunización se le inyectaron 500 µl de glóbulos rojos humanos sin ACF. Se repitió este paso a las 4 y 8 semanas. Al finalizar el período de 10 semanas se extrajo sangre de la vena marginal de la oreja y se separó el suero inmune que se utilizó para los ensayos.

Glóbulos rojos humanos.— Se extrajo sangre humana utilizando heparina al 10% como anticoagulante. Se centrifugó la sangre y los glóbulos rojos sedimentados se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente se realizó una suspensión al 5% en buffer complemento.

Plantas medicinales.— Las muestras fueron adquiridas en una herboristería en San Miguel de Tucumán. Sólo se usaron para este trabajo aquellas que resultaron de autenticidad comprobada (utilizando microscopio estereoscópico), las cuales, en número de 26, se detallan en la Tabla 1.

Preparación de extractos.— Se hicieron infusiones usando 2 g de la droga vegetal en 20 ml de agua corriente. Se llevó el agua hasta ebullición, se retiró de la fuente de calor y se agregó la droga vegetal previamente pesada. Se dejó reposar por 30 min y se extrajo la infusión usando papel de filtro. La muestra de infusión obtenida se guardó a -10°C hasta su utilización (Castro y Fernández, 2009; Castro y Muruaga, 2015).

Efecto de los extractos o infusiones sobre el complemento.— Con todas las plantas medicinales analizadas se procedió de la misma

manera. Los ensayos se hicieron por triplicado. Se procedió de acuerdo con la Tabla 2 en el cual las columnas representan los pasos sucesivos de los ensayos. El efecto Inhibidor, determinado como porcentaje de la hemólisis original producida por el complemento (medida como aumento de D.O. a 450 nm), correspondió al cambio producido por dos volúmenes de infusión mas cinco volúmenes de suero de conejo al 10%, sobre un volumen de

una suspensión de eritrocitos de mamíferos al 5% en el buffer complemento. Hemos designado como 1 (una) unidad de inhibición a una disminución de un 1% en los valores de la hemólisis sin agregados.

Determinación de la vía de actividad complementaria del suero inmune de conejo.— Se utilizó un suero inmune inactivado por calor y un suero no inmune sin inactivar en sucesi-

Tabla 1. Listado de plantas utilizadas como antiinflamatorio en medicina popular. Mezcla (a): trozos de tallo, hoja y fruto (sin flor). Mezcla (b): trozos de corteza, trozos de tallo, hoja, fruto y flor o inflorescencia. (c): trozos de rama, hoja fruto y flor.

Familias	Taxones	Nombres vulgares	Partes utilizadas
Acoraceae	<i>Acorus</i> sp.	Acoro	Rizoma
Anacardiaceae	<i>Schinopsis lorentzii</i> (Griseb.) Engl.	Quebracho colorado	Corteza
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia elegans</i> Mast.	Mil hombres	Tallo
Asteraceae	<i>Ambrosia elatior</i> L.	Altamiza	Mezcla (c)
Asteraceae	<i>Senecio</i> sp.	Chachacoma	Mezcla (c)
Asteraceae	<i>Matricaria chamomilla</i> L. Phil.	Manzanilla	Mezcla (c)
Asteraceae	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	Marcela	Mezcla (c)
Brassicaceae	<i>Lepidium didymum</i> L.	Quimpe	Mezcla (c)
Cactaceae	<i>Tunilla</i> sp.	Flor cactus	Flor
Chenopodiaceae	<i>Atriplex</i> sp.	Cachiyuyo	Hoja
Fabaceae	<i>Erythrina</i> sp.	Ceibo	Corteza
Fabaceae	<i>Geoffroea decorticans</i> (Gilles ex Hook. & Arun.) Burkart	Chañar	Mezcla (b)
Fabaceae	<i>Lupinus</i> sp.	Lupines	Semillas
Fabaceae	<i>Bauhinia forficata</i> Link spp. pruinosa (Vogel) Fortunato & Wunderlin	Pezuña de vaca	Mezcla (b)
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginco biloba	Mezcla (a)
Hamamelidaceae	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Hamamelis	Mezcla (c)
Lamiaceae	<i>Lavandula</i> sp.	Lavanda	Mezcla (c)
Lamiaceae	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Marrubio	Mezcla (c)
Lamiaceae	<i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.	Peperina	Mezcla (c)
Passifloraceae	<i>Passiflora</i> sp.	Pasionaria	Mezcla (c)
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Llantén	Mezcla (c)
Plumbaginaceae	<i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	Guaycuru	Raíz
Polygonaceae	<i>Rumex pulcher</i> L.	Lengua de vaca	Mezcla (c)
Urticaceae	<i>Parietaria debilis</i> G. Forst.	Parietaria	Mezcla (c)
Verbenaceae	<i>Lippia turbinata</i> Griseb.	Poleo	Mezcla (c)
Zygophyllaceae	<i>Larrea divaricata</i> Cav.	Jarilla	Mezcla (a)

vos ensayos para comprobar: a) la presencia de anticuerpos específicos y b) si el sistema de complemento no inactivado, puede lisar las células extrañas. Para lo primero se realizó un tratamiento previo en el cual 2 ml de suero de conejo inmunizado fue calentado a 65°C por 30 minutos. Los ensayos llevados a cabo se muestran en la Tabla 3.

RESULTADOS

Efecto de las plantas medicinales sobre el complemento de conejo inmunizado.— De un total de 26 plantas analizadas, 13 mostraron un efecto claramente inhibitorio, 2 no tuvieron diferencia con el control y 11 pusieron en evidencia un efecto amplificador de la actividad hemolítica del sistema del complemento. Una infusión inhibió la actividad complementaria en más del 75%: *Lepidium didymum*; dos lo inhibieron entre un 50% y un 75%: *Rumex pulcher* y *Marrubium vulgare*. Por otro lado *Lupinus* sp. y *Senecio* sp, mostraron una actividad inhibitoria entre el 50 y el 25%. En el caso de *Parietaria debilis*, *Ambrosia eliator*, *Plantago lanceolata*,

Achyrocline satuireioides, *Geoffroea decorticans*, *Schinopsis lorentzii*, *Acorus* sp. y *Bauhinia forficata* ssp. *pruinosa* mostraron un efecto inhibitorio menor al 25%, pero siempre claramente diferente del testigo, la actividad espontánea fisiológica del complemento. *Atriplex* sp. y *Matricaria recutita*, no presentaban diferencia significativa con respecto a la hemólisis sin tratamiento, es decir que sus valores hemolíticos fueron muy cercanos al 100% original (Fig. 1). Once muestras produjeron una actividad mayor al 100%; es decir que no inhibían, sino que parecerían aumentar el efecto hemolítico del suero de conejo, estas son: *Passiflora* sp., *Limonium brasiliense*, *Larrea divaricata*, *Ginkgo biloba*, *Aristolochia elegans*, *Lippia turbinata*, *Erythrina* sp., *Tunilla* sp., *Minthostachys mollis*, *Lavandula* sp., *Hamamelis virginiana* (datos no mostrados).

Inhibición de la vía clásica del complemento por plantas medicinales.— En el tratamiento con calor del suero inmune de conejo se puede observar que se inhibe la actividad del complemento sin afectar la actividad agluti-

Tabla 2. Efecto de plantas medicinales sobre el complemento de conejo inmunizado. En todos los casos antes de agregar los glóbulos rojos se incubó a baño María 30 minutos a 30°C. Luego de agregar los eritrocitos se llevó nuevamente a baño María a 30°C por 45 minutos, al terminar el tiempo se le agregó el buffer complemento-EDTA, se centrifugó a 1500 rpm y se leyó el sobrenadante a 450 nm.

	Suero de conejo 12,5% en buffer complemento	Infusión de plantas	Buffer complemento	Incubación	Eritrocitos 5% en PBS	Buffer complemento-EDTA	Tritón X-100 1/1000
Hemólisis con plantas	100 µl	100 µl	-	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	-
Hemólisis espontánea	-	-	200 µl	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	
Hemólisis total	-	-	-	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	200 µl

nante sobre los glóbulos rojos, incluso en una dilución de 1/64; lo que indica la presencia de anticuerpos anti-glóbulos rojos humanos. Cuando se restituye el suero no inmune, la actividad vuelve a ser la misma que se muestra en el caso donde no hubo tratamiento (Fig. 2). El suero no inmune, no presenta actividad del complemento ni aglutinante.

DISCUSIÓN

En trabajos previos se ha descrito el efecto sistema de complemento de suero sanguíneo de tortuga (Castro y Fernández, 2009), que utiliza la vía alternativa de activación, sobre eritrocitos de rata. En este

caso, la actividad del complemento de un mamífero donde la vía puesta a prueba es la vía clásica. En esta situación observamos que las infusiones de plantas medicinales inhibieron el efecto lítico, aunque también hay algunas que parecen incrementar su actividad y serán estudiadas más profundamente.

Cabe mencionar que las plantas medicinales que inhiben la actividad del sistema de complemento ponen en evidencia una posible función antiinflamatoria. Ello demostraría su importancia en la utilización de estos efectos.

De las plantas utilizadas, el quimpe (*Lepidium didymum*) inhibió la vía clásica de activación del sistema de complemento, lo

Tabla 3. Determinación de la vía de actividad complementaria de suero inmune de conejo.

	SIC	SIA	SNI	Buffer compl.	Incubación	Eritrocitos 5% en PBS	Buffer compl.- EDTA	Tritón X-100 1/1000
Tubo 1	100 µl	-	-	100 µl	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	-
Tubo 2	-	100 µl	-	100 µl	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	-
Tubo 3	-	-	100 µl	100 µl	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	-
Tubo 4	50 µl	-	50 µl	100 µl	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	-
Hemólisis espontánea	-	-	-	200 µl	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	-
Hemólisis total	-	-	-	-	30 min. 30°C	100 µl	1,7 ml	200 µl

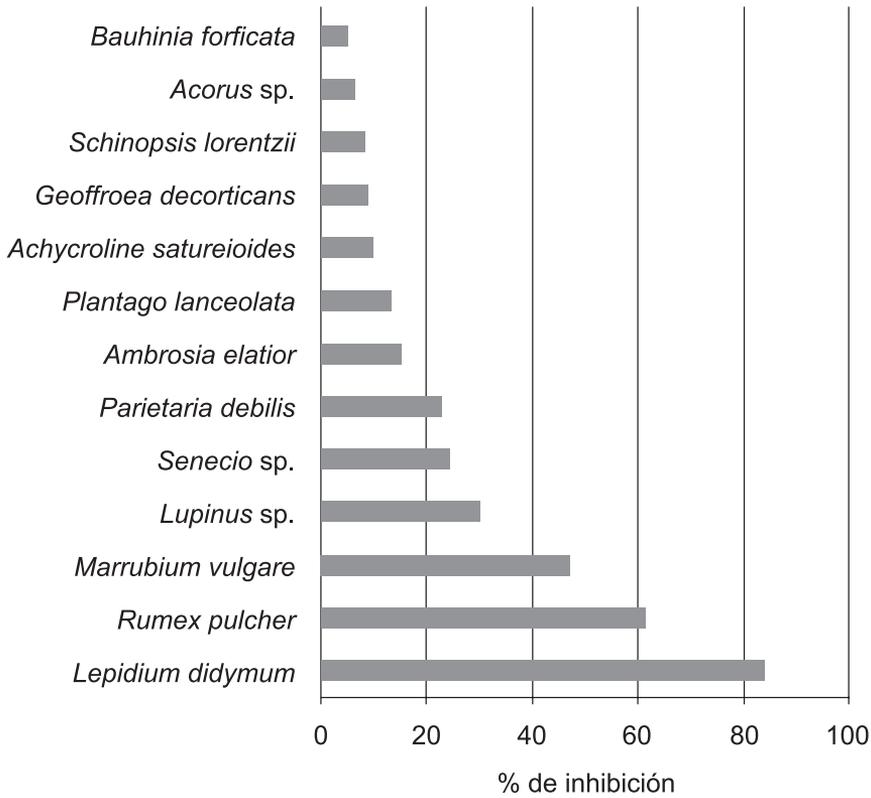


Fig. 1. Efecto inhibitorio de plantas medicinales sobre la actividad del complemento del suero sanguíneo de conejo. Porcentaje de inhibición respecto a la lisis natural. En ninguna de las muestras la dispersión de los datos supera el 8 % de coeficiente de variación.

cual representa un panorama importante de investigación ya que es una planta de fácil acceso en la provincia de Tucumán.

En los últimos tiempos se ha estudiado la relación que existe entre diferentes patologías y las plantas medicinales de uso frecuente en gran parte del mundo (Aybar *et al.*, 2001; Fawole *et al.*, 2009; Genta *et al.*, 2009; Grau *et al.*, 2001; Isla *et al.*, 200; McClatchey *et al.*, 2009; Mukazayire *et al.*, 2010; Pawlaczyk *et al.*, 2009; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Subramanyam *et al.*, 2009; Zampini *et al.*, 2009). Esto sugiere la importancia de conocer cómo actúan los componentes de las plantas medicinales, sobre todo en los componentes de la cascada del sistema de complemento. Debemos mencionar que los resultados encontrados en nuestros experimentos vinculados a la actividad inhibitoria son

coincidentes con las indicaciones usuales sobre la utilización de estas plantas en la medicina tradicional que atribuyen a algunas de ellas efectos antiinflamatorios, lo cual abre un panorama promisorio para mayores estudios al respecto. Sobre todo en la necesidad actual de la búsqueda de componentes antiinflamatorios de origen natural.

AGRADECIMIENTOS

Al la Mg Pilar Medina Pereyra y la Bqca. María Eugenia Pérez por la lectura del trabajo. Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo de la Fundación Miguel Lillo y el Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán.



Fig. 2. Actividad del suero de conejo inhibido por calor y suero sin anticuerpos. SIC: suero inhibido con calor. SIA: suero inmune. SIN: suero no inmune. En ninguna de los tratamientos la dispersión de los datos supera el 9,3% de coeficiente de variación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso J. 2007. Fitofármacos y Nutraceuticos. Editorial Corpus. Argentina, 1143 pp.
- Aybar M. J., Sánchez Riera A. N., Grau A., Sánchez S. S. 2001. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 74 (2): 125-132.
- Castro F., Fernández F. M. 2009. Actividad del sistema de complemento y de lisozima en suero sanguíneo de tortuga *Chelonii chilensis* (Quelonia). *Acta Zoológica Lilloana* 53 (1-2): 57-63.
- Castro F., Muruaga N. B. 2015. Efecto de plantas comerciales de uso medicinal sobre la actividad del complemento de suero de tortuga (*Chelonoidis chilensis*: Testudinidae). *Lilloa*, 52 (1): 12-18.
- Fawole D. A., Ndhala A. R., Amoo S. O., Finnie J. F., Van Staden J. 2009. Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in Sout Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 237-243.
- Fernández F. M. 1986. Actividad hemolítica y aglutinante natural en varias especies de anuros del noroeste argentino. *Acta Zoológica Lilloana* 38 (2): 211-221.
- Fernández F. M., Saad de Schoos S. 1990. Actividad hemolítica natural de *Waglerophis merremi* (Wagler) (Reptilia, Colubridae). *Acta Zoológica Lilloana* 39: 17-21.
- Genta S., Cabrera W., Habib N., Pons J., Carillo I. M., Grau A., Sánchez S. 2009. Yacon syrup. Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition* 28 (2): 182-187.
- Grau A., Kortsarz A. M., Aybar M. J., Sánchez Riera A. N., Sánchez S. S. 2001. El retorno del yacón. *Ciencia hoy* 11 (63): 24-31.
- Isla M. I., Nieva Moreno M. I., Sampietro A. R., Vattuone M. A. 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (2): 165-170.
- McClatchey W. C., Mahady G. B., Bennett B. C., Shiels L., Savo V. 2009. Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. *Pharmacology & Therapeutics* 123: 239-254.
- Makrides S. C. 1998. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacological Reviews* 50 (1): 59-87.
- Molares S., Ladio A. 2009. Chemosensory perception and medicinal plants for digestive ailments in a Mapuche community in NW Patagonia, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 397-406.
- Mukazayire M. J., Allaey V., Calderon P. B., Stévigny C., Bigendako M. J., Duez P. 2010. Evaluation of the hepatotoxic and hepatoprotective effect of Rwandese herbal drugs on *in vivo* (guinea pigs barbiturate-induced sleeping time) and *in vitro* (rat precision-cut liver slices, PCLS) models. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62 (3): 289-299.
- Ndhala A. R., Amoo S. O., Stafford G. I., Finnie J. F., Van Staden J. 2009. Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the Sout African tree aloe (*Aloe berberae*). *Journal of Ethnopharmacology* 124 (3): 404-408.
- Pawlaczyk I., Czerchawski L., Pilecki W., Lamer-Zarawska E., Ganczar R. 2009. Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of *Asteraceae* and *Rosaceae* families: Chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers* 77: 568-575.
- Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Drozdzolbarra M., Pérez-Rojas J. M. 2008. Medicinal

- properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Food and Chemical Toxicology 46: 3227-3239.
- Pereira D. M., Ferreres F., Oliveira J., Valentão P., Andrade P. B., Sottomayor M. 2009. Targeted metabolite analysis of *Catharanthus roseus* and its biological potential. Food and chemical toxicology 47: 1349-1354.
- Regueiro J. R., López Larrea C. 1998. Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune. Editorial Panamericana. España 198 pp.
- Sadr Lahijani M. S., Raof Kateb H. R., Heady R., Yazdani D. 2006. The effect of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) extract and tea tree (*Melaleuca alternifolia* L.) oil used as irrigants on removal of smear layer: a scanning electron microscopy study. International Endodontic Journal 39: 190-198.
- Subramanyam R., Goud M., Sudhamalla B., Reddeem E., Gollapudi A., Nellaepalli S., Yadavalli V., Chinaboina M., Amooru D. G. 2009. Novel binding studies of human serum albumin with *trans*-feruloyl maslinic acid. Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology 95: 8-88.
- Suner O., Tort L. 1994. The Complement of the teleost fish *Sparus aurata*. Annals of The New York Academy of Science 712: 371-373.
- Tsirkin J. B. 1985. The phoenician civilization in roman Spain. Gerión 3: 245-270.
- Yamada H., Kiyohara H. 1999. Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. Progress in Inflammation Research: 161-202.
- Zampini I. C., Cuello S., Alberto M. R., Ordoñez R. M., D'Almeida R., Solorzano E., Isla M. I. 2009. Antimicrobial activity of selected plant species from «the Argentine Puna» against sensitive and multi-resistant bacteria. Journal of Ethnopharmacology 124 (3): 499-505.