

**INFORME SOBRE LA EVALUACION DE UNA HIDROALCOHOLATURA DE
HIERBAS MEDICINALES Y DE SUS COMPONENTES INDIVIDUALES SOBRE LA
PROLIFERACION DE LINFOCITOS MURINOS NORMALES ESTIMULADOS.**

I. DESCRIPCIÓN:

La acción antiproliferativa de una hidroalcoholatura de hierbas medicinales fue evaluada sobre linfocitos, provenientes de ganglios linfáticos de ratones normales, estimulados *in vitro* mediante curvas dosis-respuesta y a distintos tiempos de exposición al extracto vegetal, de sus componentes individuales o del vehículo. La actividad proliferativa se determinó mediante la técnica de incorporación de [³H]-timidina ([³H]-TdR) al ADN celular y posterior evaluación de la radioactividad nuclear por espectrometría de centelleo líquido

II. ESPECIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA:

1- Extractos Vegetales:

Los extractos vegetales evaluados corresponden a la siguiente descripción:

- 1- Tintura Madre (TM): tintura constituida por la mezcla de tres tinturas individuales, a saber: tintura de *Baccharis articulata* 40 % v/v; tintura de *Rosmarinus officinalis* 40 % v/v y tintura de *Plantago major* 20 % v/v. El contenido alcohólico de la tintura madre es de 50 %.
- 2- Producto final 1 (PF1) o hidroalcoholatura: dilución 1/10 de la tintura madre en agua (tintura de *Baccharis articulata* 4 % v/v; tintura de *Rosmarinus officinalis* 4 % v/v, tintura de *Plantago major* 2 % v/v y contenido alcohólico de 5 % v/v).
- 3- Producto final 3 (PF3): dilución 1/10 de la tintura madre, con un agregado de alcohol hasta una concentración final de 15 % v/v.

2- Linfocitos normales:

Las células linfoides se purificaron de ganglios linfáticos de ratones de cepas endocriadas (BALB/c y C₃H) de 3-4 meses de edad, obtenidos en forma aséptica.

3-Condiciones de cultivo y evaluación de la proliferación celular:

Las células linfoides se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2 mM de glutamina en presencia de los antibióticos penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100µg/ml), en placas de 96 pocillos (volumen final 0.2 ml) en

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYBO)

condiciones de esterilidad, (flujo laminar, Steril Guard Hood class II, Type a/B3; marca: Baker Company, modelo: SG-400m), y en ambiente gaseado con 5% de CO₂ (estufa gaseada de CO₂; marca: Forma Scientific; modelo: 3111). Se realizaron cultivos con concentraciones crecientes de los extractos vegetales ya mencionados y en presencia o ausencia del mitógeno selectivos para linfocitos T, la Concanavalina A (Con A) en dosis mitogénicas. Las células fueron cultivadas durante 24, 48 y 72 hs y pulsadas con 0.75 µCi/pocillo de [³H]TdR (S ≥ 20 Ci/mmol) 16 hs antes del sacrificio de los cultivos (por congelación a -20 °C). Las células linfoides se cultivaron en una concentración de 1-2x10⁶ cél/ml. Los cultivos fueron posteriormente descongelados y filtrados por filtros de fibra de vidrio, Whatmann GF/A. La [³H]-TdR incorporada al ADN nuclear y retenida en dichos filtros se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido empleando solución centelladora comercial. Los resultados (obtenidos en dpm) se expresaron como Porcentaje de Inhibición (% Inhib) considerando como 100% a las dpm obtenidas en ausencia de extracto y en presencia de Con A, previa sustracción a este valor de las dpm controles sin Con A, según:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (\text{dpm Tratado} + \text{Con A} - \text{dpm control} / \text{dpm Con A} - \text{dpm control})] \times 100$$

4- Determinación de la viabilidad celular:

La viabilidad celular a distintos tiempos en presencia o ausencia de TM y PF fue evaluada mediante conteo celular microscópico en cámara de Neubauer, empleando un colorante de exclusión, el Azul Tripán. Los % de Viabilidad correspondientes se calcularon teniendo en cuenta la cantidad de células vivas (que no incluyen el colorante de exclusión) con respecto al total de células (Vivas + Muertas, es decir aquellas células que incorporan el colorante y se ven de color azul a la observación microscópica).

5- Cultivo mixto linfocitario:

Células obtenidas de ganglios linfáticos de ratones C3H(H-2^k) y BALB/c (H-2^d) fueron empleadas en cultivos mixtos linfocitarios bidireccionales. Ambas poblaciones celulares fueron cultivadas en concentraciones de 1 x 10⁶ cél/ml en un volumen final de 0.2 ml de RPMI 1640, suplementado con SFB, glutamina y antibióticos, tal como se indicó previamente. Los cultivos fueron mantenidos en estufa gaseada, a 37°C y en 5% de atmósfera de CO₂ por 120 hs, pulsados con [³H]TdR y cosechados como se describió anteriormente. Los resultados de la radioactividad incorporada en los núcleos celulares, que se evaluó tal como se indica en ítem 3 se expresan como índices de estimulación (IE) calculados como la relación entre los valores de dpm de los cultivos experimentales y las dpm obtenidas con células de cada haplotipo sin estimular, según:

IE: $\text{dpm Ax B} / (\text{dpm B} + \text{dpm A})$, donde designamos con A a las células C3H y con B a las células BALB/c.

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYBO)

6- Análisis estadístico de los resultados:

Los resultados fueron analizados mediante el Test de Student y Análisis de Varianza seguida del test de Dunnet para determinar las diferencias significativas entre grupos. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $p \leq 0.05$.

III. RESULTADOS

1. Acción anti-proliferativa dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre las células linfoides estimuladas mitógenicamente, a las 24 hs de cultivo:

TABLA 1: Porcentaje de inhibición inducido por concentraciones crecientes de la tintura madre y de los productos finales sobre la proliferación mediada por Con A de linfocitos, a las 24 hs de cultivo.

DILUCIÓN ^a	TM	DILUCIÓN ^a	PF1	PF3
	% Inhib ^b		% Inhib ^b	% Inhib ^b
1/25	96.6 ± 1.0*	1/2.5	N.D.	N.D.
1/100	82.6 ± 2.4*	1/10	88.9 ± 1.9*	89.9 ± 1.3*
1/500	65.3 ± 4.8*	1/50	81.3 ± 1.5*	72.3 ± 2.6*
1/1000	66.5 ± 4.9*	1/100	69.1 ± 2.7*	74.6 ± 2.0*
1/2000	56.2 ± 6.4 *	1/200	50.6 ± 6.1*	69.7 ± 4.1*
1/4000	22.9 ± 6.8 *	1/400	36.5 ± 5.4 *	42.3 ± 1.5 *

^a Se emplearon diluciones correlativas de TM y PF de acuerdo a su proporción en la TM. El volumen total de la dilución de productos vegetales agregados fue de 0.02 ml (máximo volumen agregado sin afectar el aporte de nutrientes en el medio de cultivo). Cabe señalar que por este motivo no se pudo evaluar (N.D. = no determinado) la dilución de PF1 y PF3 (1/2.5) equivalente a la dilución 1/25 de TM.

^b Los % de inhibición fueron calculados como se indicó anteriormente. Las dpm halladas en los cultivos controles (es decir, en ausencia de producto vegetal y sin Con A) fueron: 1490 ± 120 y en cultivos con Con A: 3332 ± 220. Cabe señalar que la presencia de 1.5 y 2 % del vehículo alcohólico (contenido alcohólico de la dilución 1/25 del PF3 y de la TM respectivamente) estimula la proliferación celular en un 25 % aproximadamente. Todas las otras diluciones de extractos vegetales fueron realizadas con una concentración final constante de alcohol de 0.5%, que no afectó la proliferación basal. Los resultados mostrados son el promedio ± E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado.

* Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.01$

Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYBO)

2. Acción anti-proliferativa dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre las células linfoides a las 48 hs de cultivo:

TABLA 2: Porcentaje de inhibición de la proliferación de células linfoides inducida por concentraciones crecientes de la hidroalcoholatura, de su tintura madre y de PF3, a las 48 hs de cultivo

DILUCIÓN ^a	TM	DILUCIÓN ^a	PF1	PF3
	% Inhib ^b		% Inhib ^b	% Inhib ^b
1/25	99.6 ± 0.4*	1/2.5	N.D.	N.D.
1/100	99.4 ± 0.8*	1/10	99.5 ± 0.3*	98.2 ± 0.8*
1/500	98.8 ± 1.3*	1/50	98.3 ± 1.6*	99.4 ± 0.2
1/1000	99.0 ± 0.2*	1/100	96.8 ± 2.1*	99.2 ± 0.3*
1/2000	84.1 ± 2.2*	1/200	67.2 ± 5.0 *	82.6 ± 2.1*
1/4000	33.3 ± 3.7	1/400	31.4 ± 6.9	48.3 ± 4.8 *

^a Se emplearon las diluciones correlativas de TM y PF tal como se describió en la Tabla 1.

^b Los porcentajes de inhibición fueron calculados según la fórmula especificada anteriormente. La radiactividad de [³H]-TdR incorporada en los cultivos controles fue: (464 ± 30) dpm y en cultivos con Con A: (28210 ± 2000) dpm.

A las 48 hs de cultivo no se observaron diferencias significativas con 1.5% y 2 % del vehículo alcohólico (dilución 1/25 de PF3 y TM, respectivamente) respecto de la proliferación basal. Todas las otras diluciones de extractos vegetales fueron realizadas manteniendo una concentración final constante de alcohol del 0.5% que tampoco afectaron la proliferación basal. Los resultados mostrados son el promedio ± E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado.

* Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.01$

Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYBO)

3. Acción anti-proliferativa dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre las células linfoides a las 72 hs de cultivo:

TABLA 3: Porcentaje de inhibición dosis-respuesta inducida por la hidroalcoholatura, su tintura madre y PF3 sobre la proliferación de células linfoides a las 72 hs de cultivo.

DILUCIÓN ^a	TM	DILUCIÓN ^a	PF1	PF3
	% Inhib ^b		% Inhib ^b	% Inhib ^b
1/25	ND	1/2.5	ND	ND
1/100	ND	1/10	ND	ND
1/500	98.2 ± 0.3*	1/50	98.5 ± 5.0*	99.6 ± 0.1*
1/1000	98.5 ± 0.6*	1/100	94.8 ± 0.1*	99.5 ± 0.1*
1/2000	96.3 ± 0.1*	1/200	49.9 ± 0.7*	81.3 ± 0.3*
1/4000	30 ± 0.7*	1/400	18.9 ± 2.1#	24.2 ± 2.1*

^a Se emplearon las diluciones correlativas de TM y PF tal como se describió anteriormente.

^b Los porcentajes de inhibición fueron calculados según la formula especificada anteriormente. La radiactividad de [³H]-TdR incorporada en los cultivos controles (es decir, en ausencia de producto vegetal y sin Con A): (350 ± 120) dpm, cultivos con Con A: (253634 ± 1500) dpm.

En todas las diluciones se mantuvo un 0.5% de contenido alcohólico que no modificó la proliferación basal. Los resultados mostrados son el promedio ± E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado. *Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.01$. #Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
 CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYBO)

4. Acción de los extractos vegetales sobre la viabilidad de las células linfoides a distintos tiempos de cultivo:

TABLA 4: Efecto de TM y PF1 yPF3 sobre la viabilidad de las células linfoides en cultivos a los distintos tiempos de estudio

TIEMPO (horas)	% VIABILIDAD ^a					
	TM			PF1		
	1/500	1/2000	1/4000	1/50	1/200	1/400
24	79	80.5	74.9	93.5	75.9	78.9
48	68.4	71.3	76.4	77.2	77.1	77.8
72	36.6	76.3	86.4	44.6	85.9	88.5
96	2	66.3	68.6	30	64.9	70.8

TIEMPO (horas)	% VIABILIDAD ^a		
	PF3		
	1/50	1/200	1/400
24	78.7	69.6	57.8
48	58.2	78.68	69.1
72	27.1	79.7	89.4
96	21	30	44.4

^a Los % de Viabilidad a cada tiempo se calcularon teniendo en cuenta la cantidad de células vivas (que no incluyen el colorante de exclusión Azul Tripán) con respecto al total de células (Vivas + muertas: células que incorporan el colorante y se ven de color azul a la observación microscópica). Los resultados se compararon con los valores promedios correspondientes a los controles y a las células incubadas por los mismos tiempos en medio con 0.5% de alcohol, los que se detallan a continuación: 83 %, 80 % y 83.6% a las 24, 48 y 72 hs, respectivamente.

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYBO)

5. Acción de los extractos vegetales sobre la proliferación de un Cultivo mixto linfocitario.

TABLA 5: Efecto de TM y PF1 y PF3 sobre la proliferación de células linfoides en cultivo mixto linfocitario.

Productos	TM			PF1			PF3		
	1/500	1/2000	1/4000	1/50	1/200	1/400	1/50	1/200	1/400
IE	0.5±0.2 [#]	1.1±0.2	1.1±0.1	0.6±0.1 [#]	1.0±0.2	1.5±0.7	0.6±0.2 [#]	0.9±0.1 [#]	0.9±0.1 [#]

Los IE fueron calculados como se describió previamente. El IE de cultivos mixtos basales, sin extractos vegetales fue de 3.58 ± 0.7

* Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.01$.

[#] Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

CONCLUSIONES:

- 1- Se observa un efecto inhibitorio (Fig. 1a 3 y Tablas 1a 3) de la proliferación de células linfoides normales inducido por los productos vegetales TM, PF1 y PF3. Dicho efecto es concentración dependiente. Se observa en los tres tiempos estudiados, 24, 48 y 72 hs de cultivo. Este efecto alcanza su máximo a las 48 hs de cultivo.
- 2- Se ha encontrado concordancia entre los efectos ejercidos por los PF y la TM, en los tres tiempos estudiados.
- 3- La observación microscópica con un colorante de exclusión permite inferir que tanto PF como TM tienen un efecto citostático a las 24 hs ya que no modificaron significativamente la viabilidad celular, sin embargo con el tiempo parecería darse también un efecto citotóxico, fundamentalmente con las concentraciones mas altas (Tabla 4).
- 4- La inhibición de la proliferación celular también fue observada en un modelo de cultivo mixto linfocitario, en el cual, los productos ensayados produjeron una disminución del IE en forma significativa principalmente con las concentraciones mayores (Tabla 5)

Conclusión Final: El hecho de que tanto las TM como sus PF ejerzan un efecto anti-proliferativo contundente sobre las células normales *in vitro*, no implica necesariamente que esta acción se reproducirá en estudios *in vivo*, por lo tanto, se sugiere llevar a cabo estudios de esta índole.

Figura 1: Porcentaje de inhibición de la proliferación de linfocitos normales estimulados con Con A. Curva dosis-respuesta inducida por la tintura madre a diferentes tiempos de cultivo.

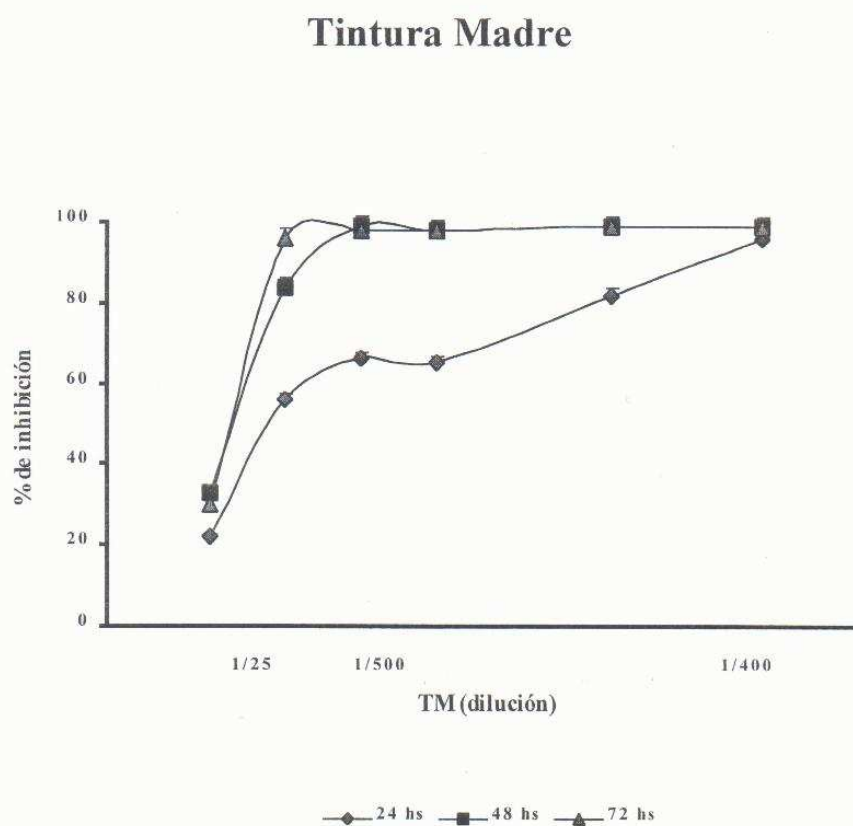


Figura 2: Porcentaje de inhibición de la proliferación de células T normales estimuladas mitogénicamente. Curva dosis-respuesta inducida por el producto final 1 (PF1) a diferentes tiempos de cultivo.

Producto Final 1

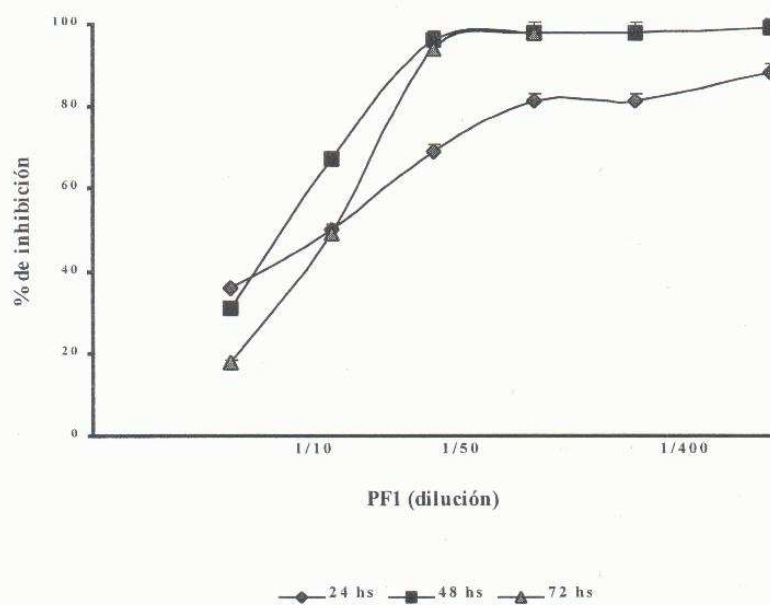
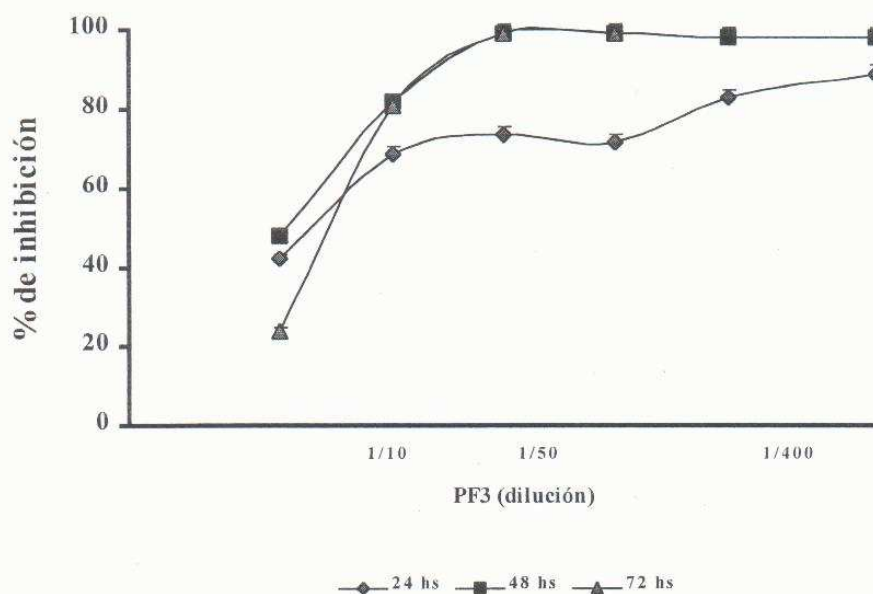


Figura 3: Porcentaje de inhibición de la proliferación de linfocitos normales estimulados mitogénicamente. Curva dosis-respuesta inducida por el producto final 3 (PF3) a diferentes tiempos de cultivo.

Producto Final 3



Bs. As., 12 de Agosto 2004

[Signature]
Dra. GRACIELA CREMASCHI
VICE-DIRECTORA
CEFYBO CONICET

[Signature]
CLAUDIA A. ADESINI

Serrano 669 - C1414DEM - Argentina - Tel: 4855-7194 Fax: (54-11) 4856-2751
E-mail: postmaster@cefybo.edu.ar