

Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica

Dagmar García Rivera

República de Cuba - Centro de Química Farmacéutica



**Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de
Mangifera indica L. sobre la funcionalidad de los
macrófagos y la respuesta alérgica**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Farmacéuticas

Dagmar García Rivera



LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA
CENTRO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Título: “Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de Mangifera indica L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica”

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Autora: Lic. Dagmar García Rivera

Tutores: Dr. René Delgado Hernández

Dr. José Manuel Leiro Vidal

Ciudad de La Habana
2006

615.19-Gar-E

Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica / Dagmar García Rivera; René Delgado Hernández, tutor; José Manuel Leiro Vidal, tutor -- Ciudad de La Habana : Editorial Universitaria, 2008. -- ISBN 978-959-16-0812-3. -- 136 pág. -- Centro de Química Farmacéutica. -- Tesis (Doctor en Ciencias Farmacéuticas).

1. García Rivera, Dagmar
2. Delgado Hernández, René, tutor
3. Leiro Vidal, José Manuel, tutor
4. Ciencias Pedagógicas

Edición: Luz María Rodríguez Cabral

Corrección: Dr. C. G. Torricella Morales

Diseño de cubierta: Elisa Torricella Ramirez



Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba, 2008

La *Editorial Universitaria* publica bajo licencia Creative Commons de tipo Reconocimiento No Comercial Sin Obra Derivada, se permite su copia y distribución por cualquier medio siempre que mantenga el reconocimiento de sus autores, no haga uso comercial de las obras y no realice ninguna modificación de ellas. La licencia completa puede consultarse en:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/legalcode>

Editorial Universitaria

Calle 23 entre F y G, No. 564,

El Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400, Cuba.

e-mail: torri@reduniv.edu.cu

Sitio Web: <http://revistas.mes.edu.cu>

SÍNTESIS

En el presente estudio se demostró que el extracto acuoso de la corteza de M. indica posee efecto inmunomodulador sobre importantes funciones de los macrófagos y la respuesta alérgica y que la mangiferina está implicada en los efectos del extracto.

El extracto de M. indica inhibió in vivo la quimiotaxis e in vitro la fagocitosis, la producción de óxido nítrico, el proceso de transcripción de los genes que codifican para las citocinas TNF α , IL-1 β y GM-CSF, las enzimas COX-2 y NOS-2 y el factor de transcripción nuclear NF κ B; y estimuló la transcripción de los genes de TGF β en macrófagos peritoneales.

Por otra parte, el extracto también posee propiedades inmunomoduladoras sobre la respuesta alérgica. El extracto mostró efecto inhibitorio in vivo en un modelo de alergia inflamatoria inducida por ovoalbúmina e inhibió la proliferación linfocitaria específica al antígeno OVA en ratones inmunizados. Además inhibió la reacción cutánea inducida por histamina en ratas, la liberación de histamina de mastocitos peritoneales, la producción de IgE en ratones y la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea en ratas.

La mangiferina tuvo efectos farmacológicos de tipo inhibitorio igual que el extracto sobre la quimiotaxis, la fagocitosis, la expresión de la NOS-2 y la COX-2 en macrófagos peritoneales. Igualmente inhibió la proliferación linfocitaria, la reacción cutánea a la histamina, la liberación de histamina, la producción de IgE y la anafilaxia cutánea, lo que sugiere que este polifenol está implicado en los efectos inmunomoduladores del extracto sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica.

Los resultados de esta investigación constituyen parte de la base experimental preclínica necesaria para la realización de ensayos clínicos controlados en inmunopatologías como la artritis reumatoide o el asma bronquial.

ÍNDICE

	Pág.
Introducción	1
Hipótesis	5
Objetivos	5
1. Capítulo 1. Revisión Bibliográfica	6
1.1. El sistema inmune.....	6
1.2. Principales mediadores celulares implicados en la respuesta inmune.....	6
1.2.1. Linfocitos.....	6
1.2.2. Sistema monocito-macrófago.....	7
1.2.3. Células dendríticas.....	8
1.2.4. Mastocitos y basófilos.....	8
1.2.5. Eosinófilos.....	9
1.3. Principales mediadores moleculares implicados en la respuesta inmune	9
1.3.1. Anticuerpos.....	9
1.3.2. Citocinas.....	10
1.3.2.1. Caracterización molecular y funcional de algunas de las principales citocinas relacionadas con la respuesta inmune.....	11
1.3.3. Moléculas de adhesión.....	15
1.3.4. Quimiocinas.....	16
1.3.5. Histamina.....	16
1.3.6. Óxido nítrico, especies reactivas de nitrógeno y óxido nítrico sintasas.....	17
1.3.7. Factor de transcripción nuclear κ B.....	19
1.3.8. Otros mediadores moleculares relacionados con la respuesta inmune.....	21
1.4. Mecanismos inmunológicos implicados en algunos tipos de respuesta inmune.	22
1.4.1. Respuestas inmunes caracterizadas por activación de macrófagos.....	22
1.4.2. La respuesta alérgica o de hipersensibilidad inmediata.....	23

1.5. Algunas enfermedades relacionadas con alteraciones de las funciones del sistema inmune.	25
1.6. Tratamientos más utilizados en las enfermedades de origen inmunopatológico.	26
1.7. Modulación de la síntesis o expresión de mediadores de la respuesta inmune por compuestos de origen natural.....	29
1.8. <u>Mangifera indica</u> L.	31
1.8.1. Extracto acuoso de la corteza de <u>Mangifera indica</u> L.	32
2. Capítulo 2. Materiales y Métodos	35
2.1. Obtención del extracto estandarizado de la corteza de <u>M. indica</u> y de la mangiferina.....	35
2.2 Consideraciones bioéticas.....	36
2.3. Evaluación del efecto inmunomodulador del extracto de <u>M. indica</u> y mangiferina en la funcionalidad de macrófagos peritoneales	36
2.3.1. Ensayo de citotoxicidad celular	37
2.3.2. Ensayo <u>in vivo</u> de quimiotaxis celular	37
2.3.3. Ensayo <u>in vitro</u> para determinar actividad fagocítica	38
2.3.4. Ensayo <u>in vitro</u> para la determinación de la producción de óxido nítrico.....	39
2.3.5 Determinación de la expresión de genes que codifican para enzimas, citocinas y factores de transcripción relacionados con la respuesta inmune	40
2.3.5.1. Determinación de los niveles de ARNm de <u>NOS-2</u> , <u>COX-1</u> , <u>COX-2</u> , <u>NFκB</u> e <u>IκB</u> por reacción de reverso transcripción y de la polimerasa en cadena (RT-PCR).....	41
2.3.5.2. Determinación de la expresión de las enzimas <u>NOS-2</u> y <u>COX-2</u> mediante el ensayo de <u>slot-blot</u>	43
2.3.5.3. Determinación de los niveles de ARNm de <u>TNFα</u> , <u>IL-1β</u> , <u>IL-6</u> , <u>GM-CSF</u> y <u>TGFβ</u> por reacción de reverso transcripción y reacción múltiple de la polimerasa en cadena (RT-MPCR).....	45

2.3.5.4.	Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de <u>TNFα</u>	46
2.4.	Evaluación del efecto del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina en la respuesta alérgica.....	47
2.4.1.	Modelo <u>in vivo</u> de inflamación alérgica.....	47
2.4.1.1.	Inmunización de los animales y tratamientos.....	47
2.4.1.2.	Edema plantar inducido por OVA.....	48
2.4.1.3.	Ensayo de proliferación linfocitaria en respuesta a estimulación con OVA.....	49
2.4.2.	Reacción cutánea inducida por histamina en ratas	49
2.4.3.	Ensayo para la determinación <u>in vitro</u> de la liberación de histamina inducida por el compuesto 48/80 en mastocitos peritoneales de ratas.....	50
2.4.4.	Ensayo para determinar IgE específica	52
2.4.4.1	Tratamientos y obtención del antisuero de los ratones	52
2.4.4.2.	Prueba de anafilaxia pasiva cutánea para determinar IgE específica	52
2.4.5.	Respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas	53
2.5.	Análisis estadístico.....	54
3.	Capítulo 3. Resultados	55
3.1.	Efectos del extracto de <u>M. indica</u> y mangiferina sobre la funcionalidad de los macrófagos peritoneales.....	55
3.1.1.	Efecto <u>in vivo</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la capacidad quimiotáctica de macrófagos peritoneales de ratas.....	55
3.1.2.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de ratas.....	56
3.1.3.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la producción de óxido nítrico de macrófagos peritoneales de ratas.....	58
3.1.4.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> sobre los niveles de ARNm de la <u>NOS-2</u> en macrófagos peritoneales murinos.....	58
3.1.5.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la expresión de la enzima <u>NOS-2</u> en macrófagos peritoneales murinos	59

3.1.6.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> sobre los niveles de ARNm de la COX-1 y la COX-2 en macrófagos peritoneales murinos.....	60
3.1.7.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la expresión de la COX-2 en macrófagos peritoneales murinos.....	61
3.1.8.	Efecto del extracto de <u>M. indica</u> sobre los niveles de ARNm de <u>NFκB</u> e <u>IκB</u> en macrófagos peritoneales murinos.....	62
3.1.9.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> sobre los niveles del ARNm de citocinas relacionadas con el proceso inflamatorio en macrófagos peritoneales murinos.....	63
3.1.10.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> sobre la expresión de <u>TNFα</u> en macrófagos peritoneales murinos.....	65
3.2.	Efectos del extracto acuoso de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la respuesta alérgica.....	66
3.2.1.	Efecto <u>in vivo</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre el edema plantar inducido por ovoalbúmina y en la proliferación linfocitaria específica al antígeno en ratones inmunizados.....	66
3.2.2.	Efecto <u>in vivo</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre el incremento de permeabilidad capilar inducido por histamina en ratas	68
3.2.3.	Efecto <u>in vitro</u> del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la liberación de histamina de mastocitos peritoneales de ratas.....	69
3.2.4.	Efecto del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la producción de IgE en ratones.....	70
3.2.5.	Efecto del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas.....	71
4.	Capítulo 4. Discusión	73
4.1.	El extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina modulan importantes funciones de los macrófagos.....	73
4.2.	El extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina inhiben importantes mediadores de la respuesta alérgica.....	89

4.3. Consideraciones finales.....	100
5. Conclusiones y Recomendaciones	101
5.1 Conclusiones	101
5.2 Recomendaciones	102
6. Referencias Bibliográficas	103

Todas las universidades de Cuba en una:

EDUNIV
Editorial Universitaria



INTRODUCCIÓN.

Los productos naturales han sido históricamente utilizados por el hombre para el tratamiento de diversas patologías, muchas veces sin conocer certeramente el mecanismo por el que logran ejercer determinado efecto terapéutico ni cuales son los componentes responsables de los mismos.

En nuestro país se ha fomentado y rescatado en los últimos años, tanto por la población como por las instituciones sanitarias, el uso de las plantas medicinales con el objetivo de complementar los tratamientos convencionales de numerosas patologías. De igual forma se han estimulado las investigaciones científicas que caracterizan los mecanismos farmacológicos por los que los productos naturales contribuyen a la mejoría de diferentes enfermedades.

La población cubana ha utilizado durante más de 30 años un extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica* L. (*M. indica*) para el tratamiento de diversas patologías entre las que se incluyen diferentes tipos de neoplasias, lupus eritematoso sistémico, asma bronquial, dermatitis atópica, artritis reumatoide y otras [Guevara y cols., 2002; Tamayo y cols., 2001]. El Centro de Química Farmacéutica, teniendo en consideración la experiencia etnomédica, ha desarrollado un nuevo producto obtenido por extracción acuosa de la corteza de *M. indica* con el objetivo de caracterizar sus propiedades farmacológicas para explicar su utilización en el tratamiento de esas y otras patologías.

Además de la experiencia popular cubana, la literatura científica le atribuye a extractos obtenidos de diferentes partes del árbol de *M. indica* actividades biológicas tales como antipirético [Awe y cols., 1998], espasmolítico [Kambu y cols., 1990], antidiabético

[Aderibigbe y cols., 2001], inmunomodulador [Makare y cols., 2001] y antioxidante [Scartezzini y Speroni, 2000].

El extracto acuoso de la corteza de *M. indica*, comercializado bajo la Marca Registrada VIMANG[®] como suplemento nutricional o cosmeceútico antioxidante, tiene una composición química que incluye nueve compuestos polifenólicos cuyo componente mayoritario es la glucosilxantona mangiferina. También se determinó la presencia de terpenoides, azúcares libres, ácidos grasos, polioles y microelementos [Núñez-Sellés y cols., 2002].

Los estudios farmacológicos realizados han demostrado que este extracto posee propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias que permiten explicar, al menos en parte, las evidencias clínicas encontradas en el tratamiento de pacientes aquejados de las patologías antes mencionadas, que en su mayoría están relacionadas con desbalances oxidativos y procesos inflamatorios [Martínez y cols, 2000; 2003; Sánchez y cols., 2000; Garrido y cols., 2001; 2004 a,b; 2005, 2006].

La mangiferina, el principal polifenol del extracto, posee actividad inmunomoduladora, antitumoral, antiviral, hipoglicemiante, anti-inflamatoria y antioxidante [Guha y cols., 1996; Yoosook y cols., 2000; Miura y cols., 2001; Scartezzini y Speroni, 2000]. Las investigaciones farmacológicas demuestran que la presencia de este polifenol en el extracto de *M. indica* está relacionada con sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias [Sánchez y cols., 2000; Garrido y cols., 2004a].

Existe una estrecha relación entre la inflamación, el desbalance oxidativo y la respuesta inmune, y el profundo conocimiento que se tiene hoy de la complejidad de estos fenómenos permite comprender esta relación. La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) puede modular la expresión de numerosas moléculas (citocinas, anticuerpos, factores de

transcripción y otras) involucradas en las respuestas inmunes e inflamatorias, lo que ha relacionado algunos trastornos en la inmunidad con el desbalance oxidativo y las funciones antioxidantes con las propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras de los fármacos [Matés y cols., 2000]. La respuesta inflamatoria es parte y consecuencia de algunos tipos de respuesta inmune y varias de las citocinas producidas por macrófagos, células T y mastocitos conducen al reclutamiento celular, el incremento de permeabilidad vascular, la vasodilatación y otros eventos característicos de la inflamación. Otro punto en común entre estos fenómenos lo constituye la actividad del propio macrófago, pues es una de las principales fuentes de producción de ERO, especies reactivas de nitrógeno (ERN), mediadores proinflamatorios y es uno de los ejes centrales en la activación de la respuesta inmune adaptativa induciendo coestimulación para la activación de las células T. Los mastocitos son células muy implicadas en la respuesta alérgica y también son capaces de producir ERO y mediadores inflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos [Robbie-Ryan y Brown, 2002]. Además, se ha correlacionado la producción de ERO y el fallo en los mecanismos de defensa antioxidantes del organismo con la aparición de enfermedades inmunopatológicas como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, el cáncer, la diabetes mellitus, diferentes tipos de enfermedades alérgicas, entre otras [Matés y cols., 1999]. Por todas estas razones y teniendo en consideración las propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias del extracto de *M. indica*, se decidió estudiar sus efectos sobre algunos aspectos de la respuesta inmune.

Estudios previos demostraron que el extracto de *M. indica* es capaz de modular la respuesta inmune humoral por inhibición de la síntesis de determinados isotipos de anticuerpos, lo que también constituye un importante antecedente para esta investigación [García y cols., 2003b]. De igual forma, otras investigaciones postularon un efecto antialérgico del extracto y la

mangiferina pero en un diseño experimental basado en la infestación con el helminto *Trichinella spiralis* [García y cols., 2003a], el cual no constituye propiamente un modelo adecuado para evaluar actividad antialérgica, a pesar que reproduce algunas de las características de la respuesta alérgica, como el incremento de IgE, la mastocitosis y la eosinofilia [Santamarina y cols., 1993].

Los antecedentes citados anteriormente permiten considerar que este extracto acuoso de la corteza de *M. indica* puede presentar efecto inmunomodulador y que la mangiferina, por ser el componente mayoritario y poseer propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes e inmunomoduladoras, puede estar involucrada en las acciones del extracto. Dada la complejidad de la respuesta inmune, se decidió caracterizar específicamente los efectos del extracto y la mangiferina en la funcionalidad de los macrófagos y en la respuesta alérgica, lo que constituye la esencia del presente trabajo. En este sentido, demostrar que el extracto de *M. indica* es capaz de modular estos aspectos de la respuesta inmune y caracterizar sus mecanismos de acción resulta novedoso desde el punto de vista científico, pues permitirá profundizar en la caracterización de una nueva propiedad farmacológica no descrita anteriormente para el extracto y complementará la información científica publicada al respecto. Por otra parte, esta investigación podría tener una repercusión práctica y social porque constituye una importante contribución al conocimiento preclínico necesario para la realización de ensayos clínicos controlados en patologías relacionadas con trastornos de las funciones de los macrófagos o procesos alérgicos como la artritis reumatoide o el asma bronquial.

Teniendo en consideración las investigaciones precedentes y el estado actual de la temática, se postuló la siguiente hipótesis de trabajo: “**El extracto acuoso de Mangifera indica L. posee efecto inmunomodulador sobre la funcionalidad de macrófagos y la respuesta alérgica**”

Para probar o negar la validez de la hipótesis se trazaron los objetivos siguientes:

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar el efecto inmunomodulador del extracto de M. indica sobre la funcionalidad de los macrófagos y algunos parámetros de la respuesta alérgica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto del extracto acuoso de la corteza de M. indica in vivo sobre la quimiotaxis e in vitro sobre la fagocitosis y la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratas.
2. Caracterizar el efecto in vitro del extracto acuoso de la corteza de M. indica sobre el proceso de transcripción de los genes que codifican para enzimas como NOS-2, COX-1 y COX-2, citocinas como TNF α , IL-1 β , TGF β , IL-6 y GM-CSF y el factor de transcripción nuclear NF κ B en macrófagos peritoneales de ratones.
3. Evaluar el efecto in vivo del extracto acuoso de la corteza de M. indica sobre la respuesta alérgica inflamatoria y la proliferación linfocitaria específica de antígeno.
4. Caracterizar el efecto in vivo del extracto acuoso de la corteza de M. indica sobre la reacción cutánea a la histamina, la producción de IgE, la respuesta anafiláctica e in vitro sobre la liberación de histamina de los mastocitos.
5. Determinar si la presencia de mangiferina está involucrada en los efectos farmacológicos del extracto.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. El sistema inmune

El sistema inmune es el resultado de un complejo proceso evolutivo que le ha permitido a la especie humana sobrevivir a la infinidad de microorganismos y sustancias agresivas del ambiente [Medzhitov y Janeway, 1997]. Éste se distingue por dos niveles de respuesta: la innata y la adaptativa. La innata constituye la línea de defensa inmediata frente a la entrada de los microorganismos para su eliminación, es poco específica, no genera memoria y está constituida por barreras anatómicas y fisiológicas, diversos tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos y las células asesinas naturales. El sistema adaptativo es evolutivamente posterior al innato, su respuesta es de gran especificidad y con la característica distintiva de generar memoria inmunológica. Sus componentes celulares principales son los linfocitos B y T [Gray, 2000].

La respuesta inmune efectora involucra a las células de ambos tipos de inmunidad así como a los mediadores moleculares por ellas producidos como anticuerpos, citocinas, ERO, ERN histamina, moléculas de adhesión, enzimas, factores de transcripción, entre otros.

1.2. Principales mediadores celulares implicados en la respuesta inmune

1.2.1. Linfocitos

Los linfocitos son importantes células sanguíneas del sistema inmune que se originan en la médula ósea. Existen distintos tipos de estas células que difieren en sus funciones y productos proteicos: linfocitos B, T y células asesinas naturales.

Los linfocitos B son las únicas células del organismo capaces de producir anticuerpos. La interacción de los antígenos con sus receptores de membrana y otras señales coestimuladoras inician la secuencia de activación, proliferación y diferenciación que culmina en el desarrollo

de células plasmáticas que secretan activamente anticuerpos y de células memorias capaces de perdurar largos períodos de tiempo para enfrentar exposiciones sucesivas al mismo antígeno [Abbas y cols., 1996].

Los linfocitos T terminan de madurar en el timo y se subdividen además en poblaciones funcionalmente distintas; las más estudiadas son las células T cooperadoras y las T citotóxicas. Las principales funciones de las células T cooperadoras son la producción de citocinas y la cooperación celular, mientras que las células T citotóxicas inducen la lisis de células infectadas y también producen citocinas [Abbas y cols., 1996].

La tercera clase importante de linfocitos no expresa marcadores de células T ni B. Estos son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos capaces de lisar células tumorales e infectadas por virus, conocidas como células asesinas naturales [Carayannopoulos y Yokoyama, 2004].

1.2.2. Sistema monocito-macrófago

El sistema mononuclear fagocítico ha sido definido como un linaje de células hematopoyéticas derivadas de progenitores en la médula ósea. El primer tipo de células que entra a la circulación sanguínea es el monocito que no está completamente diferenciado y una vez que colonizan los tejidos y maduran se convierten en macrófagos [Hume, 2006]. Sus principales funciones en la inmunidad innata son la fagocitosis de partículas extrañas, la producción de citocinas necesarias para la activación de la respuesta inmune y la coestimulación a las células T para su activación [Abbas y cols., 1996].

Los macrófagos son células denominadas inflamatorias pues participan en las diferentes etapas de este proceso mediante la producción de citocinas, quimiocinas, ERO y ERN, activación de enzimas y factores transcripcionales. Son células que representan el ejemplo más claro de

población celular de vital importancia para la inmunidad innata que cumple funciones en la inmunidad adquirida, pues constituyen células presentadoras de antígenos (CPA) capaces de inducir coestimulación a las células T como resultados del reconocimiento antigénico a través de sus TLR (del inglés Toll like receptor). Además, las citocinas que producen contribuyen al control de la diferenciación de las células T [Hume, 2006]. El desbalance en el control de las funciones de este sistema mononuclear fagocítico se relaciona con la fisiopatología de diferentes enfermedades [Medzhitov, 2001].

1.2.3. Células dendríticas

Las células dendríticas son un complejo y heterogéneo grupo multifuncional de leucocitos que se originan en la médula ósea y que constituyen en la actualidad el eje central de la respuesta inmune porque integran la información de la inmunidad innata y la expresan a las células de la inmunidad adquirida. Éstas pueden activarse por medio del reconocimiento de patrones moleculares de virus, bacterias, hongos y parásitos a través de sus TLR. Su activación es un proceso flexible, que puede originar dos tipos de células dendríticas que secretan patrones de citocinas diferentes y activan respuestas inmunes adaptativas tipo Th1 o Th2 [Reis-Sousa, 2004].

1.2.4. Mastocitos y basófilos

Los mastocitos y basófilos son células originadas en la médula ósea a partir de progenitoras hematopoyéticas. Los basófilos maduran en la médula ósea y luego circulan en la sangre periférica de donde pueden ser atraídos hacia los tejidos, mientras que los mastocitos no circulan en la sangre y terminan su maduración en los tejidos vascularizados. Bajo condiciones fisiológicas, los basófilos tienen una corta vida media, apenas varios días, mientras que los mastocitos tienen una larga vida y una vez maduros, pueden proliferar bajo determinadas

condiciones [Galli, 2000]. Ambas son células que desempeñan un papel patológico fundamental en los procesos inflamatorios relacionados con la alergia e incluso se plantea además la contribución de los mastocitos a la autoinmunidad [Robbie-Ryan y Brown, 2002]. Una vez inducida su desgranulación, son capaces de liberar importantes mediadores como histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, ERO y ERN [Wedemeyer y cols., 2000].

1.2.5. Eosinófilos

Los eosinófilos son leucocitos granulares originados en la médula ósea que desempeñan un papel fundamental en la fase tardía de la inflamación alérgica, así como en la defensa contra parásitos. Sus membranas expresan receptores para inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas y otros factores quimiotácticos, haciéndolas sensibles a una amplia variedad de moléculas que las estimulan a secretar mediadores inflamatorios como proteínas catiónicas, leucotrienos y citocinas [Dombrowicz y Capron, 2001].

1.3. Principales mediadores moleculares implicados en la respuesta inmune

1.3.1. Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas sintetizadas exclusivamente por las células B y su capacidad de reconocimiento específico constituye una poderosa herramienta del sistema inmune. Existen cinco tipos de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) humanas, diferenciados por el tipo de cadena pesada en su estructura: IgM, IgD, IgA, IgG e IgE, con diversidad en sus funciones efectoras, excepto la IgD que solo participa en el reconocimiento antigénico. Las Ig participan en importantes funciones de la respuesta inmune como la activación del complemento por la vía clásica, opsonización, inducción de mecanismos de citotoxicidad, neutralización de antígenos y respuestas de hipersensibilidad [Janeway y cols., 2000].

La IgE es el principal anticuerpo involucrado en las respuestas alérgicas o de hipersensibilidad tipo I, tiene un peso molecular aproximado de 190 kD y a diferencia de otras Ig, no activa el complemento por la vía clásica. La IgE es termolábil, su tiempo de vida medio es de uno a cinco días en sangre periférica y su concentración en el suero es la menor de los cinco isotipos de Ig humanas. Es capaz de unirse por su porción Fc a receptores de alta afinidad denominados FcεRI, ubicados en la superficie de los mastocitos y basófilos, desencadenando la desgranulación de estas células y la liberación de importantes mediadores que activan la respuesta alérgica [Saini y MacGlashan, 2002].

1.3.2. Citocinas

La comunicación entre las células del sistema inmune es fundamentalmente dependiente de proteínas de bajo peso molecular denominadas citocinas, las cuales regulan importantes procesos biológicos como el crecimiento y activación celular, la inflamación, la inmunidad, la reparación de tejidos y la fibrosis. Estas proteínas son secretadas por una gran variedad de células, incluyendo monocitos, macrófagos, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células dendríticas, keratinocitos, linfocitos B y T, mastocitos, basófilos, líneas de células tumorales, entre otras [Kulmatycki y Jamali, 2001].

En condiciones normales y libres de estrés, las concentraciones de citocinas son muy bajas, pero se incrementan notablemente bajo cambios fisiopatológicos y ante el daño tisular. La secreción de citocinas por los linfocitos T y los macrófagos desempeñan un papel muy importante en la patogénesis de algunas enfermedades, por lo que la expresión y las funciones de las citocinas constituyen importantes dianas para el tratamiento de enfermedades inmunopatológicas [Morel y Oriss, 1998].

1.3.2.1. Caracterización molecular y funcional de algunas de las principales citocinas relacionadas con la respuesta inmune

TNF α (del inglés tumor necrosis factor): El **TNF α** es una proteína de 17 kDa no glicosilada que se sintetiza y se secreta fundamentalmente por los macrófagos en respuesta a estímulos de diferente naturaleza, aunque otros tipos celulares como mastocitos, neutrófilos, linfocitos T, eosinófilos, fibroblastos y células asesinas naturales también lo producen [Temkin y Levischaffer, 2001]. Esta citocina se libera como mediador preformado en algunos tipos de células y su síntesis de ново se estimula por acción de otras citocinas, complejos inmunes, IFN γ y otros. Se han identificado dos tipos de receptores para **TNF** que se denominan **TNF-R1** (CD120a) de 55 kDa y **TNF-R2** (CD120b) de 75 kDa [van Puidenbroek y cols., 1999].

El **TNF α** promueve por sí mismo la inflamación, la infiltración leucocitaria, la formación de granulomas, la fibrosis tisular e induce la producción de otras citocinas pro-inflamatorias en varias células. Su efecto celular más notable es inicialmente disparar la transcripción de los genes controlados por la activación del factor de transcripción nuclear **κ B** (**NF κ B**, del inglés nuclear factor κ B) e inducir actividad de la enzima fosfolipasa A2 con la consecuente liberación de ácido araquidónico y sus metabolitos fundamentales: prostaglandinas y leucotrienos. Además, causa alteraciones del endotelio, promueve procesos trombóticos, tiene efecto quimioatrayente sobre neutrófilos y mejora su adherencia al endotelio, estimula la síntesis de quimiocinas como IL-8, mejora la fagocitosis en macrófagos y neutrófilos e induce el estallido respiratorio caracterizado por la producción de ERO, ERN, IL-1, factores estimulantes de colonias, IFN γ , metabolitos del ácido araquidónico y activación de enzimas pro-inflamatorias [van Puidenbroek y cols., 1999]. En linfocitos, el **TNF α** estimula la

expresión del MHC I y II y es un potente activador de NFκB en varios tipos celulares [Baumgartner y cols., 1994; Temkin y Levi-schaffer, 2001].

IL-1: La IL-1 existe en dos formas codificadas por genes diferentes: la IL-1 α predominante en ratones con bajo nivel de secreción y la IL-1 β predominante en humanos con altos niveles de secreción tisular, pero ambas con gran similitud estructural y funcional. La IL-1 β es una proteína de 17 kDa, producida fundamentalmente por macrófagos activados y neutrófilos [Dinarelo, 2004a]. La expresión de los genes y la síntesis de IL-1 se disparan por ligandos de los TLR tales como endotoxinas, otras citocinas como TNF α , IFN tipo I y II, antígenos, mitógenos y otros estímulos. Existen dos tipos de receptores de diferente afinidad para la IL-1 que unen ambas isoformas. El receptor tipo uno (CD121a) se expresa fundamentalmente en células T mientras que el tipo dos (CD121b) aparece en células B, granulocitos y macrófagos. Se ha descrito además una forma soluble de receptor para la IL-1. La unión de la IL-1 a su receptor estimula la expresión de este, activa vías de señalización que incrementan los niveles intracelulares de AMPc y activa NFκB [Dinarelo, 2005].

La principal actividad biológica de la IL-1 es la estimulación de las células T cooperadoras para que secreten IL-2 y expresen el receptor de la IL-2. Además, estimula la proliferación de las células B y la síntesis de inmunoglobulinas, induce la activación de células asesinas naturales, promueve la adhesión endotelial de neutrófilos y monocitos por estimulación de la expresión de moléculas de adhesión y aumenta el metabolismo del ácido araquidónico. En el cerebro, esta citocina induce la expresión de sus receptores en la red vascular hipotalámica induciendo la síntesis de la COX-2 con un incremento de las concentraciones de prostaglandina E2, la cual activa el centro termorregulador y produce fiebre; en la médula ósea incrementa la movilización de progenitores de granulocitos y neutrófilos maduros. Por todas

estas acciones biológicas la IL-1 es considerada una citocina pro-inflamatoria [Dinarello, 2004b].

IL-6: La IL-6 humana es una proteína de 212 aminoácidos con un 65% de homología con la murina, que se produce en muchos tipos celulares como linfocitos T y B, monocitos, fibroblastos, keratinocitos, células endoteliales y otras, en respuesta a estímulos como LPS, virus, $TNF\alpha$ e IL-1. Su receptor está compuesto por dos subunidades, una cadena α (CD126) de 80 kDa que es la que une IL-6 y una cadena β (CD130) de 130 kDa conocida como gp130 que es responsable de la transducción de señales y se expresa en células T, células B activadas por mitógenos, monocitos periféricos y macrófagos [Barton, 2005].

La IL-6 es una citocina pleiotrópica con un amplio rango de actividades biológicas que desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune y la inflamación [Nishimoto y Kishimoto, 2004]. Sus funciones incluyen la inducción del crecimiento de células T y la diferenciación de células T citotóxicas, incremento de la secreción de IL-2 y de la expresión de su receptor, inducción de la producción de anticuerpos por células B, estimulación de la diferenciación de macrófagos, megacariocitos y osteoclastos e inducción en los hepatocitos de la producción de proteínas de fase aguda, entre otras [Naka y cols., 2002]. Tiene efectos duales en la inflamación y a pesar de haber sido clasificada como una citocina pro-inflamatoria, existen evidencias experimentales que indican que posee efectos anti-inflamatorios, como el hecho de que la producción de IL-6 por células dendríticas pulmonares favorece la diferenciación a $Th2$ e inhibe la respuesta $Th1$ [Dogde y cols., 2003].

GM-CSF (del inglés granulocyte-macrophage colony stimulating factor): El GM-CSF es una proteína monomérica de 127 aminoácidos con dos sitios de glicosilación secretada por células T y macrófagos en respuesta a la activación por antígenos o mitógenos, aunque otros tipos

celulares como células endoteliales y fibroblastos también la producen por estimulación con TNF α , IL-1, IL-2 e IFN γ . Su receptor está compuesto por dos subunidades cuya agregación le confieren alta afinidad por su ligando [Kamijo y cols., 2002].

El GM-CSF es considerado una citocina pro-inflamatoria. Esta proteína es indispensable para el crecimiento y desarrollo de las células progenitoras de granulocitos macrófagos, pues estimula a los mieloblastos y monoblastos y dispara la diferenciación irreversible de estas células. Además, el GM-CSF sinergiza con la eritropoyetina en la proliferación de células progenitoras eritroides y megacariocíticas, es un poderoso quimiotáctico de neutrófilos y mejora la actividad microbicida, el metabolismo oxidativo, la fagocitosis de neutrófilos y macrófagos e induce además la liberación de metabolitos del ácido araquidónico y producción de ERO en estas células [Warringa y cols., 1991; Hamilton, 2002].

TGF β (del inglés transforming growth factor): El TGF β es una citocina con importantes funciones inmunorreguladoras secretada por linfocitos, macrófagos y células dendríticas. Su expresión sirve como método de control autocrino y paracrino de la activación, proliferación y diferenciación de estas células [Letterio y Roberts, 1998]. Esta proteína existe al menos en cinco isoformas, cuyas propiedades son cualitativamente similares de forma general y son consecuencia de su interacción con al menos cinco receptores, donde TGF β -RI y TGF β -RII son los mejor caracterizados [Itoh y cols., 2000].

El TGF β es el inhibidor más potente del crecimiento de células epiteliales normales y transformadas, células endoteliales, fibroblastos, células neuronales, células linfoides y otros tipos de células hematopoyéticas, hepatocitos y keratinocitos. Posee actividad inhibitoria sobre diferentes funciones como la proliferación de linfocitos T por regulación negativa de las señales proliferativas mediadas por la IL-2, el crecimiento de células asesinas naturales, la

síntesis del GM-CSF y la expresión del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés granulocyte colony stimulating factor). De forma general, se comporta como una citocina anti-inflamatoria [Lum y cols., 1996; Huang y Huang, 2005].

1.3.3. Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión son un grupo de proteínas cuyas funciones están relacionadas con el tráfico linfocitario y agrupa a las selectinas, los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las integrinas [Harlan y Winn, 2002].

Las selectinas están especializadas para interacciones de alta afinidad con sus ligandos, lo que termina con la captura y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio vascular [Khan y cols., 2003]. En este grupo se incluyen las selectinas E, P y L, las cuales unen ligandos glicanos multivalentes expresados en numerosas proteínas de superficie y están involucradas en los eventos iniciales de la adhesión [Wild y cols., 2001].

Las integrinas son por defecto no adhesivo y solo cuando son estimuladas por sus ligandos, miembros de la familia de las Ig, se activan y participan en el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio. Las moléculas LFA-1 (del inglés, leukocyte function-associated antigen-1) y VLA-4 (del inglés, very late antigen) son ejemplos de integrinas, mientras que a la superfamilia de las Ig pertenecen las moléculas de adhesión intercelular uno y dos (ICAM-1 e ICAM-2, del inglés intercellular adhesion molecule) y la molécula de adhesión vascular (VCAM, del inglés vascular cellular adhesion molecule). Las interacciones entre los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las integrinas son cruciales para la diapédesis de los leucocitos y su paso a través del endotelio [Harlan y Winn, 2002].

1.3.4. Quimiocinas

Las quimiocinas son pequeñas proteínas secretadas que regulan el tráfico leucocitario y se originan en diversos tipos celulares como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células T, células epiteliales, keratinocitos, mastocitos entre otros, en respuesta a estímulos como citocinas y LPS [Moser y Loetscher, 2001]. Dentro de las quimiocinas se encuentran: RANTES recluta células T y eosinófilos, la IL-8 atrae macrófagos y neutrófilos, la eotaxina influye en el reclutamiento de eosinófilos, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1, del inglés monocyte chemoattractant protein-1) es quimioatrayente selectiva de monocitos y la proteína inflamatoria del macrófago (MIP-1 β , del inglés macrophage inflammatory protein) incrementa la adhesión de las células T citotóxicas a las células endoteliales [Homey y Zlotnik, 1999; Godessart y Kunkel, 2001].

1.3.5. Histamina

La histamina es una amina biógena con importantes efectos en la respuesta inmune, aunque participa en otras funciones no relacionadas con la inmunidad. Sus acciones biológicas están mediadas por su interacción con receptores histaminérgicos tipo uno, dos, tres, y cuatro y sus efectos en la respuesta alérgica están relacionados con su interacción con los receptores tipo uno fundamentalmente [Packard y Khan, 2003]. En el sistema cardiovascular provoca dilatación de los vasos sanguíneos por interacción con sus receptores tipo uno y dos, causando disminución de la resistencia periférica total, incremento de la permeabilidad vascular y fallo en la presión sanguínea sistémica. La histamina estimula varias terminaciones nerviosas, por tanto, cuando se libera en la epidermis produce prurito y en la dermis induce dolor [Oda y Matsumoto, 2001].

La histamina modula la actividad de células inmunocompetentes como los mastocitos, basófilos y células T, contribuyendo así a la patogénesis de las enfermedades alérgicas. En mastocitos y basófilos induce la desgranulación y liberación de los mediadores preformados en los gránulos citoplasmáticos, así como la síntesis de novo mediadores que contribuyen a la respuesta alérgica. Asimismo, mejora la secreción de citocinas tipo Th2 e inhibe las de tipo Th1 [Packard y Khan, 2003].

1.3.6. Óxido nítrico, especies reactivas de nitrógeno y óxido nítrico sintasas

El óxido nítrico (NO, del inglés nitric oxide) es una simple molécula biatómica, no cargada y con un electrón desapareado, implicado en una amplia colección de funciones fisiológicas que incluyen la relajación de la musculatura lisa, la inhibición de la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la respuesta inmune [Martin y cols., 2000]. Es sintetizado a partir de la L-arginina y el oxígeno molecular por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, del inglés nitric oxide synthase) y con requerimientos adicionales de NADPH como donador de electrones. Existen al menos tres isoformas de NOS codificadas por genes diferentes: la NOS-1 o neuronal que se encuentra en altas concentraciones en el cerebro, la NOS-2 o inducible (iNOS) que se expresa fundamentalmente en macrófagos y en otros tipos celulares como hepatocitos, células de la musculatura lisa vascular, fibroblastos y células epiteliales, y la NOS-3 o endotelial (eNOS) expresada en células endoteliales [Coleman, 2001].

Las enzimas NOS-1 y NOS-3 se expresan constitutivamente en las células y sus funciones se activan rápida y transientemente por señales de calcio mediadas por calmodulina. Las concentraciones de NO que producen estas enzimas son menores de 1 μM . La NOS-2 no se expresa en células en reposo ni sus funciones se afectan por las concentraciones de calcio intracelular, y las concentraciones de NO que producen son superiores a 1 μM . La expresión

de NOS-2 se induce por estímulos como endotoxinas bacterianas y citocinas proinflamatorias como IL-1, IFN γ y TNF α . Para ello se requiere una fase entre la activación celular y la producción de NO producto del tiempo necesario para la síntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la proteína NOS-2 [Coleman, 2001].

El NO es un segundo mensajero altamente difundible que puede ejercer sus efectos relativamente lejos de su sitio de producción y que es capaz de atravesar fácilmente la membrana celular. En células endoteliales, neuronas y plaquetas, el NO a bajas concentraciones activa directamente la guanilatociclasa por interacción con el grupo hemo de esta enzima, que convierte el GTP en GMP cíclico, segundo mensajero intracelular, lo que le atribuye al NO un importante papel en el control de la presión sanguínea, la neurotransmisión y las funciones plaquetarias [Martin y cols., 2000]. Su efecto vasorrelajante le hizo atribuible inicialmente el nombre de factor relajante derivado del endotelio [Palmer y cols., 1987].

La principal función del NO producido a altas concentraciones por la NOS-2 es microbicida, pero se manifiestan efectos tóxicos producidos como consecuencia de su interacción con O₂ molecular o el radical anión superóxido (O₂^{•-}) y de la formación de ERN. Bajo condiciones aeróbicas el NO es rápidamente oxidado a ERN, formándose el dióxido de nitrógeno (NO₂), el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) y el tetraóxido de trinitrógeno (N₂O₄). El N₂O₃ es el principal producto de oxidación en disolución acuosa y en los sistemas biológicos. Cuando la célula está sometida a un alto proceso de estrés oxidativo y nitrosativo, con altas concentraciones de NO y O₂^{•-}, estos dos radicales interactúan para generar el anión peroxinitrito (ONOO⁻) altamente reactivo y responsable de muchos de los efectos tóxicos del NO [Coleman, 2001; Davis y cols., 2001].

El NO regula además la actividad funcional, el crecimiento y la muerte de células diversas como macrófagos, linfocitos T, CPA, mastocitos, neutrófilos y células asesinas naturales. En mastocitos, el NO suprime la desgranulación inducida por el antígeno, la liberación de mediadores y la síntesis de citocinas [Coleman, 2002]; en células T inhibe la producción de citocinas Th1 y a la vez promueven la respuesta Th2 y la producción de IgE en células B [Barnes y Liew, 1995], aunque otros autores plantean que el NO inhibe tanto la producción de citocinas tipo Th1 como Th2 [Bauer y cols., 1997].

El papel del NO en la inflamación no está finalmente esclarecido, pero se evidencia una combinación de efectos tóxicos, regulatorios, apoptóticos y antiapoptóticos en diferentes tipos celulares y en diferentes momentos del proceso inflamatorio. Por ejemplo, mejora o inhibe la activación de los neutrófilos dependiendo de la concentración [Armstrong, 2001], inhibe la expresión de los genes de IL-1, IL-8, IL-6, IFN γ y TNF α , la unión al ADN del NF κ B e interfiere en varias vías de señalización intracelular [Coleman, 2001].

1.3.7. Factor de transcripción nuclear κ B

La familia de factores de transcripción NF κ B, expresada en la mayoría de los tipos celulares, está compuesta por cinco proteínas relacionadas estructuralmente y evolutivamente conservadas: NF κ B1 o p50, NF κ B2 o p52, RelA o p65, RelB y RelC [Karin y Ben-Neriah, 2000]. Estos factores de transcripción permanecen inactivos en el citoplasma de las células en reposo mediante asociación con su inhibidor, un complejo de proteínas denominado I κ B, formado por I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , p105 y p100 (estos últimos son los precursores de p50 y p52). Para la activación de NF κ B, las I κ B son fosforiladas en dos residuos de serina aminoterminales por las kinasas del complejo IKK, lo que conduce a su ubiquitinación y subsecuente degradación en el proteosoma celular. El complejo IKK está constituido por al

menos dos subunidades catalíticas relacionadas, $IKK\alpha$ (o $IKK1$) e $IKK\beta$ (o $IKK2$) y una unidad reguladora esencial $IKK\gamma$. La degradación de $I\kappa B$ conduce a la traslocación de los dímeros de $NF\kappa B$ al núcleo, donde se unen a sitios conocidos como κB en la secuencia del promotor de genes inducibles [Puel y cols., 2004].

El $NF\kappa B$ se activa rápidamente por estimulación de un amplio rango de receptores involucrados en la respuesta inmune innata y adaptativa, tales como TLR [Takeda y cols., 2003], receptores de citocinas para IL-1 [Dinarello, 1997], $TNF\alpha$ [Aggarwal, 2003], IL-15 [Musikacharoen y cols., 2001], IL-17 [Schwandner y cols., 2000], receptores para antígenos de las células B y T [Ruland y Mak, 2003] así como por acción de ERO y ERN [Canty y cols., 1998]. El $NF\kappa B$ controla la expresión de una gran variedad de genes relacionados con las funciones del sistema inmune: moléculas de adhesión como $ICAM-1$, $ICAM-2$, $ICAM-5$, $VCAM$ y selectina E; citocinas como $GM-CSF$, $G-CSF$, IFN tipo uno, IL-12, IL-2, IL-6, $TNF\alpha$, IL-1; receptores como $TLR1-9$, IL-1R, la cadena α del IL-2R y la cadena β del receptor de células T; quimiocinas como $MCP-3$, $RANTES$ y eotaxina; enzimas como COX-2, $NOS-2$, fosfolipasa A2 y 5-lipooxigenasa; algunos de sus propios componentes como $NF\kappa B1$, $NF\kappa B2$, $I\kappa B\alpha$, RelA, Rel B, así como proteínas de fase aguda, kinasas de señales de transcripción y otros factores de transcripción nuclear [Li y Verma, 2002; Leiro y cols., 2004]. Por el control que ejerce este factor sobre la expresión de los genes antes mencionados, está involucrado en importantes procesos de la respuesta inmune como la proliferación y activación linfocitaria, el reconocimiento inmune, el cambio de clase de los isotipos de Ig, la función de citocinas y la expresión de sus receptores, la activación de mecanismos efectoros del sistema inmune, la apoptosis, el reclutamiento celular, la inflamación, entre otros. Este

factor de transcripción nuclear constituye una diana molecular importante para la modulación de la respuesta inmune [Hatada y cols., 2000].

1.3.8. Otros mediadores moleculares relacionados con la respuesta inmune

Además de los mediadores anteriormente mencionados, existe otro grupo importante de ellos involucrados en la respuesta inmune, cuyas funciones principales se resumen brevemente en la Tabla 1.

Tabla 1. Funciones de otros mediadores moleculares relacionados con la respuesta inmune

Mediador molecular	Funciones en la respuesta inmune
Especies reactivas de oxígeno (ERO)	Las ERO son producidas por macrófagos, neutrófilos y otras células fagocíticas, y su función principal en la respuesta inmune es la acción microbicida contra agentes infecciosos. No obstante, ejercen funciones inmunorreguladoras como la inhibición de la proliferación de linfocitos que contribuye al estado de inmunodeficiencia que acompaña algunos procesos infecciosos y la inducción o supresión de la apoptosis en varias células del sistema inmune. Estas especies interfieren en vías de señalización intracelular pues facilitan la fosforilación de tirosinas de Stat3 y Jak2 [Carballo y cols., 1999], activan el factor <u>NFκB</u> por inhibición de la degradación de <u>IκBα</u> e impiden por tanto la actividad transcripcional de <u>NFκB</u> en células T [Lahdenpohja y cols., 1998]. Estimulan la síntesis de eicosanoides, fosfolipasas, factores de crecimiento y citocinas [Dworski, 2000].
Prostaglandinas (PG)	Las PG inhiben la proliferación de linfocitos T y de células asesinas naturales y modulan selectivamente la síntesis de citocinas [Snijdwint y cols., 1993; Betz y Fox, 1991]. Inhiben además la liberación de histamina mediada por IgE en mastocitos [Hashimoto y cols., 2005].
Ciclooxigenasas (COX)	Las COX son enzimas que participan en la respuesta inflamatoria por catalizar el primer paso en la conversión del ácido araquidónico a PG. Se han caracterizado dos isoformas de la enzima COX: una constitutiva denominada COX-1 y otra inducible conocida como COX-2. La COX-1 tiene funciones fisiológicas bien determinadas, su activación conduce a la producción de prostaciclina, que liberada por el endotelio es antitrombogénica y cuando la secreta la mucosa gástrica tiene efecto citoprotector, mientras que la COX-2 es inducida por variados estímulos proinflamatorios, particularmente citocinas y factores de crecimiento en el lugar de la inflamación, y produce PG relacionadas con la respuesta inflamatoria. Recientemente se ha descrito una COX-3 presente en corteza cerebral y corazón fundamentalmente, y sus actividades biológicas están

	relacionadas con la inducción del dolor y la fiebre [Chandrasekharan y Simmons, 2004; Chandrasekharan y cols., 2002].
--	---

1.4 Mecanismos inmunológicos implicados en algunos tipos de respuesta inmune

1.4.1. Respuestas inmunes caracterizadas por activación de macrófagos

Los macrófagos están implicados en la mayoría de las respuestas inmunes que se desencadenan en el organismo por la diversidad de funciones que desempeñan; sin embargo, existen algunos tipos de respuestas inmunes en las que sus mecanismos efectores están más involucrados [Hume, 2006].

La hipersensibilidad retardada (HR) es una forma de reacción inmunitaria mediada por células en la que la célula efectora final es el macrófago activado, representado hasta el 90% de la población celular infiltrada. Este tipo de inmunidad mediada por células forma parte del mecanismo de defensa primario frente a microorganismos bacterianos, para lo cual se requiere la estimulación de la función microbicida de los macrófagos por las citocinas producidas por las células Th1, fundamentalmente el IFN γ . Cuando el estímulo es demasiado persistente, la HR se vuelve destructiva para el tejido como consecuencia del proceso inflamatorio inducido por la activación de los macrófagos. Este aspecto inmunopatológico se manifiesta en la llamada reacción granulomatosa, en la que los macrófagos con los microorganismos sin eliminar en su interior, se adhieren unos a otros adquiriendo morfologías epitelioides y se fusionan entre sí dando lugar a la formación de células gigantes multinucleadas, que pueden llegar a desplazar al tejido normal formando nódulos o tubérculos que conducen a la necrosis del tejido [Abbas y cols., 1996].

Además de la enfermedad granulomatosa, existen otras enfermedades que involucran este tipo de respuesta inmune inflamatoria crónica. Uno de los casos más representativos es la artritis reumatoide, donde la inflamación puede ser un efecto secundario provocado por una hiperactivación del sistema inmune, que amplifica la magnitud y gravedad de esta enfermedad

[Gerlag y cols., 2000]. La HR también se manifiesta en enfermedades como la tuberculosis y ciertos tipos de dermatitis por contacto [Ali y cols., 1997]. La desregulación de la respuesta de HR puede conducir a enfermedades crónicas que cursan con inflamación y donde la activación de linfocitos T y de macrófagos puede ser la clave de la patogenia [Kotzin y cols., 2000; Gerlag y cols., 2000].

Cuando los mecanismos de activación de los macrófagos persisten, por permanencia del estímulo antigénico o por desregulaciones de los mecanismos inhibitorios, se produce un estado de sobreactivación celular que conlleva a la excesiva producción de mediadores inflamatorios, lo que conduce a un proceso inflamatorio tal que puede terminar con la lesión tisular [Ali y cols., 1997; Issekutz y cols., 1988].

1.4.2. La respuesta alérgica o de hipersensibilidad inmediata

El principal mecanismo involucrado en el desencadenamiento de la respuesta de hipersensibilidad inmediata o de tipo alérgica es la estimulación de los mastocitos y basófilos por la interacción de antígenos tipo alérgenos con la IgE específica unida a los receptores de alta afinidad FcεR de la superficie celular [Kinet, 2002]. El entrecruzamiento de estos receptores resulta en la activación celular y el inicio de cascadas de transducción de señales que inducen la liberación de dos grupos de mediadores biológicamente activos que causan la reacción alérgica. Los primeros son mediadores preformados y acumulados en los gránulos citoplasmáticos de estas células, como histamina, heparina, serotonina y proteasas, así como TNFα e IL-4 [Robbie-Ryan y Brown 2002]. Los segundos son nuevos mediadores sintetizados como LTC₄, factor activador de plaquetas y PGD₂. En el caso de los mastocitos, también son capaces de producir citocinas como IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, TNFα, y varias quimiocinas como la IL-8, MCP-1, y MIP-1β [Wedemeyer y cols., 2000], mientras

que los basófilos tienen un espectro más restringido en la producción de citocinas, limitado a IL-4 e IL-13. Sin embargo, los basófilos humanos y no los mastocitos son los primeros productores de estas citocinas tipo Th2 [Gibbs, 2005].

Un mecanismo importante en el desencadenamiento de una respuesta alérgica es el desarrollo de respuesta inmune tipo Th2 a proteínas inhaladas. Este constituye un ejemplo de malfuncionamiento del sistema inmune, en el cual antígenos no microbianos pueden generar una falsa alarma inmunológica e inducir la maduración de células dendríticas tipo dos, capaces de favorecer la diferenciación de las células T cooperadoras a Th2, las cuales producen citocinas características e inducen la síntesis de IgE e IgG1 por las células B [Eisenbarth y cols., 2003].

La hematopoyesis es un fenómeno importante en la persistencia de la respuesta alérgica, pues la iniciación y el mantenimiento de la proliferación y maduración de mastocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos son procesos estimulados por diferentes citocinas producidas durante esta respuesta [Denburg, 1999].

La acción combinada de todas estas células y sus mediadores tienen importantes efectos en la activación y reclutamiento de células inflamatorias, la contracción del músculo liso, la vasodilatación, el incremento de la permeabilidad vascular, la broncoconstricción, el incremento de la secreción de moco y otros eventos asociados con la respuesta alérgica [Bradding, 2003].

Recientes estudios revelan que la iniciación y progresión de las reacciones alérgicas no solo se debe a una excesiva activación celular, sino a deficiencias en receptores inhibitorios tipo Fc γ RIIB y gp49B1 expresados en mastocitos, basófilos, células B, entre otras. Por ejemplo, el receptor Fc γ RIIB inhibe la activación mediada por el receptor de células B y en mastocitos y

basófilos inhibe la activación mediada por FcεRI [Katz, 2002]. Igualmente, la literatura reconoce la existencia de un tipo de célula T reguladora o Th3 que secreta TGFβ y que reduce la intensidad de las respuestas alérgicas [Akbari y cols., 2003].

1.5. Algunas enfermedades relacionadas con alteraciones de las funciones del sistema inmune

A pesar de la importancia del sistema inmune para el organismo, existe un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por alteraciones en sus funciones, bien por exceso o defecto en la producción de algunos mediadores, por sobreactivación de diferentes mecanismos efectores, por pérdida de la tolerancia inmunológica, fallos en los mecanismos de regulación, o por inmunodeficiencias congénitas y adquiridas [Abbas y cols, 1996].

Las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, son ejemplos clásicos de alteraciones en las capacidades discriminatorias del sistema inmune, que conducen a la pérdida de la tolerancia y la producción de autoanticuerpos y células T autorreactivas [Lartigue y cols, 2005]. Las patologías mencionadas anteriormente y otras como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, el cáncer y el Alzheimer, han sido atribuidas entre otros factores, al desbalance en las funciones de las células T cooperadoras y al descontrol en la producción de citocinas por diferentes tipos celulares incluidos los macrófagos [Sack y cols., 2000].

El desbalance en el control de las funciones de los macrófagos ha sido relacionado con la fisiopatología de diferentes enfermedades como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple y otras [Medzhitov, 2001; Zhao y Schwartz, 1998; Kulmatycki y Jamali, 2001].

Las enfermedades alérgicas como la rinitis, la dermatitis atópica o el asma bronquial constituyen otro importante grupo de patologías donde se manifiestan alteraciones de la respuesta inmune explicadas en el acápite anterior. En la tabla 2 se exponen las alteraciones inmunológicas producidas en algunas de estas enfermedades.

Tabla 2. Alteraciones inmunológicas producidas en algunas enfermedades.

Enfermedad	Alteraciones inmunológicas más importantes
Enfermedades alérgicas: rinitis, asma bronquial, dermatitis atópica, otras.	Activación mastocitaria con liberación de mediadores preformados y sintetizados de <u>novo</u> , promoción de eosinofilia y de citocinas <u>Th2</u> como IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13, incremento de la producción de IgE e IgG1 [Romagnani, 2000].
Artritis reumatoide	Incremento de las concentraciones de <u>TNFα</u> como mediador proinflamatorio fundamental, así como IL-1, IL-6, <u>GM-CSF</u> y quimiocinas como IL-8, <u>RANTES</u> , <u>MIP-1</u> y <u>MCP-1</u> , producción de autoanticuerpos [Kulmatycki y Jamali, 2001].
Esclerosis múltiple	Incremento de las concentraciones de <u>TNFα</u> en suero y fluido cerebroespinal y de la expresión de <u>ICAM-1</u> en endotelio cerebral y astrocitos, elevadas concentraciones de varias moléculas de adhesión y quimiocinas <u>MCP-1</u> , <u>MCP-2</u> , <u>MCP-3</u> , <u>RANTES</u> , y <u>MIP-1α</u> y β y sus receptores [Zhao y Schwartz, 1998; Ledeen y Chakraborty, 1998].
Enfermedad de Crohn.	Incremento en la expresión de <u>TNFα</u> , <u>IFNγ</u> , IL-2, IL-12, IL-6, elevada actividad de las células <u>Th1</u> [Kulmatycki y Jamali, 2001].

1.6. Tratamientos más utilizados en las enfermedades de origen inmunopatológico

La inmunomodulación se define como cambios en el sistema inmune causados por agentes que activan, reestablecen o suprimen sus funciones, por tanto, el término “inmunomoduladores” incluye a los fármacos inmunoestimulantes, inmunosupresores y restauradores así como aquellos otros cuyos mecanismos de acción impliquen cambios en algunas de las etapas o de los mediadores de la respuesta inmune [Bouic y cols., 1996]. Aunque la inmunoterapia es la forma más novedosa de tratar algunos de los trastornos del

sistema inmune, la modulación farmacológica ha sido tradicionalmente la conducta terapéutica más utilizada para estos fines.

El tratamiento farmacológico de las enfermedades que se originan por trastornos inmunopatológicos incluye a los antihistamínicos, los esteroides, los anti-inflamatorios no esteroideos, los inhibidores de LT, los antagonistas de receptores de citocinas, entre otros [Packard y Khan, 2003; Schleimer, 2004; Coffey y Golden, 2003; Simmons y Buckley, 2005].

Los antihistamínicos tipo uno son medicamentos utilizados fundamentalmente en trastornos de origen alérgico como la rinitis, las dermatitis e incluso el asma bronquial. Estos fármacos antagonizan de forma más o menos selectiva la unión de la histamina a sus receptores tipo uno, inhibiendo así los efectos causados por este mediador. La elucidación del papel que ejerce la histamina sobre el balance de citocinas Th1/Th2 provee las bases para el uso de estos antihistamínicos en la prevención y tratamiento del asma atópica [Packard y Khan, 2003]. Por ejemplo, la terfenadina inhibe in vitro la producción de citocinas Th2 como IL-4 e IL-5 [Munakata y cols., 1999], mientras que cetirizine inhibe el reclutamiento de eosinófilos [Testa y cols., 2001].

Los glucocorticoides (GC) son fármacos muy útiles en el tratamiento de enfermedades de origen inmunopatológico tan diversas como el asma bronquial, la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico y su mecanismo de acción se ha estudiado durante más de 50 años [Schleimer, 2004]. Los GC actúan en diversas etapas de la respuesta inmune y sobre varios mediadores: inhiben la producción de quimiocinas por células epiteliales, suprimen la expresión de moléculas coestimuladoras como B7 en las CPA influyendo en la activación del infiltrado linfocitario, suprimen la liberación de citocinas como TNF α , IL-1 e IL-12, mejoran la expresión epitelial de los TLR, inhiben la expresión de la NOS-2, COX-2 y la actividad de

la fosfolipasa A2. Algunos de los efectos inhibitorios sobre citocinas y enzimas proinflamatorias son consecuencia de la inhibición que ejercen sobre NFκB, mediada por un incremento en la transcripción y expresión del inhibidor IκB, lo que favorece la permanencia de NFκB en el citoplasma celular [Schleimer, 2004; Heasman y cols., 2003].

Los anti-inflamatorios no esteroideos y específicamente los inhibidores selectivos de la COX-2, se utilizan extensamente en el tratamiento anti-inflamatorio de procesos inmunopatológicos como diferentes tipos de artritis, con demostrada efectividad y ligera reducción de los efectos adversos gastrointestinales pero con incremento del riesgo de la toxicidad cardiovascular por posibilidad de ocurrencia de eventos trombóticos. En el año 2005, el Comité de Avisos de la FDA emitió un comunicado que informaba que todos los inhibidores selectivos de COX-2 aprobados en los EUA tienen significativos riesgos cardiovasculares, orientó retirar algunos del mercado e incluir esta información en las etiquetas de los medicamentos [Abramson y Weaver, 2005].

La terapia anti-leucotrienos también se utiliza como tratamiento antiinflamatorio, específicamente en el asma bronquial, pues se basa en la inhibición de la síntesis de LT o en el bloqueo de sus receptores [Coffey y Golden, 2003].

En los últimos 10 años uno de los principales avances en el tratamiento de la inflamación fue la introducción de las terapias biológicas contra citocinas y ejemplo clásico ha sido las terapias anti-TNFα con infliximab, etanercept o adalimumab, las cuales se probaron inicialmente para el tratamiento de la artritis reumatoide, pero hoy incluyen nuevas indicaciones como la espondilitis anquilosante, la artritis psoriática, la psoriasis y la enfermedad de Crohn en el caso del infliximab [Simmons y Buckley, 2005].

El significativo avance en el entendimiento molecular de los mecanismos que regulan la respuesta inmune ha permitido desarrollar nuevas estrategias y agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades inmunopatológicas, muchas de ellas basadas en el diseño de anticuerpos monoclonales que bloqueen receptores y otras moléculas involucradas en la respuesta inmune. Por ejemplo, Amevive (alefacept) es una proteína quimérica inmunosupresora, diseñada para bloquear el receptor CD28 de las células T y evitar su interacción con la molécula de adhesión LFA-3 expresada en la CPA, interacción que amplifica la primera señal generada por el reconocimiento antigénico por el receptor de célula T (TCR, del inglés T cell receptor). Su utilización en el tratamiento de la psoriasis fue bien tolerado y con excelentes resultados clínicos [Ellis y Krueger, 2001]. Otras terapias denominadas de antiadhesión utilizan anticuerpos monoclonales humanizados y no humanizados que actúan directamente contra ICAM-1 o ICAM-3 [Aruffo y Hollenbaugh, 2001]. Varias investigaciones se centran en la búsqueda de inhibidores de la molécula coestimuladora CD28 y en la interferencia con otras señales coestimuladoras de las células T [Carreno y cols., 2005], en terapias anti-células B, en el bloqueo de receptores de un gran número de citocinas, así como en otras variantes menos explotadas como la modulación del repertorio de células T y su propio TCR [Simmons y Buckley, 2005].

1.7. Modulación de la síntesis o la expresión de mediadores de la respuesta inmune por compuestos de origen natural

Los productos naturales constituyen una gran fuente de compuestos capaces de modular algunos de los mediadores o de los mecanismos de la respuesta inmune. Entre los compuestos de origen natural con propiedades inmunomoduladoras podemos citar a los polifenoles,

alcaloides, quinonas, terpenoides, esteroides, polisacáridos, glicoproteínas, entre otros [Wagner, 1990].

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Dentro de los polifenoles se incluyen las xantonas, los diferentes tipos de flavonoides, las coumarinas, los taninos y otras moléculas, las cuales son importantes constituyentes de un gran número de extractos obtenidos de fuentes naturales y poseen una gran variedad de actividades biológicas relacionadas con las funciones del sistema inmune. Las catequinas son flavonoides presentes en el té capaces de disminuir la producción de IL-1 β e incrementar los niveles de IL-10 [Crouvezier y cols., 2001], la quercetina y la rutina inhiben la presentación de péptidos por las CPA [Gong y Chen, 2003] y tienen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios [Rotelli y cols., 2003], las xantonas antagonizan los receptores del factor activador de plaquetas [Jantan y cols., 2001], las coumarinas inhiben la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2, la producción de PGE2 y la liberación de NO [Abad y cols., 2001].

Los terpenoides constituyen otro importante grupo de compuestos capaces de modular funciones del sistema inmune. La literatura reporta que poseen actividad inhibitoria sobre la producción de TNF α , IL-6, IL-8, IFN γ , IL-1 β , IL-2 e IL-4 [Duan y cols., 1999], en la degradación de I κ B y consecuentemente en la activación de NF κ B [Jeong y cols., 2002], en la producción de ERO y en las concentraciones de NOS-2, COX-2 y PGE2 [Li, 2000; Whan y cols., 2001].

La literatura científica reconoce varios extractos naturales con propiedades inmunomoduladoras, lo que promueve la utilización de estos para el tratamiento complementario de enfermedades relacionadas con alteraciones inmunopatológicas. El

Pycnogenol® es un extracto de la corteza de *Pinus pinaster* que reduce la expresión de ICAM-1 y la activación de NFκB [Saliou y cols., 2001], las preparaciones de *Tripterygium wilfordii* inhiben la producción de importantes citocinas proinflamatorias como TNFα, IL-6, IL-8, IFNγ, IL-1β e IL-2, la proliferación de linfocitos T y B y la formación de anticuerpos [Duan y cols., 1999; Li, 2000], extractos de *Withania somnifera* estimulan funciones inmunes como la producción de anticuerpos y la actividad fagocítica [Davis y Kuttan, 2000] y el extracto metanólico de *Cyperus rotundus* inhibe la producción ERO y NO en macrófagos [Seo y cols., 2001].

Igualmente, la comunidad científica reconoce varios productos naturales que actúan sobre mecanismos relacionados con la respuesta alérgica, como extractos acuosos y alcohólicos de *Striga orobanchioides* que inhiben las contracciones inducidas por histamina en íleo de cobayos y la desgranulación de los mastocitos [Harish y cols., 2001] y preparaciones obtenidas de los frutos de *Rubus coreanus* inhiben el choque anafiláctico sistémico inducido por el compuesto 48/80 [Kim y cols., 2002].

1.8 Mangifera indica L.

Mangifera indica L. es una especie perteneciente a la familia Anacardiaceae, que se introdujo en Cuba en 1782 y se cultiva actualmente en todas las regiones del país [Roig, 1988].

La literatura científica le atribuye a extractos obtenidos de diferentes partes del árbol de *Mangifera indica* L. (*M. indica*) actividades biológicas tales como antiardiáscico [Ponce-Macotella y cols., 1994], antipirético [Awe y cols., 1998], espasmolítico [Kambu y cols., 1990], antidiabético [Aderibigbe y cols., 2001], inmunomodulador [Makare y cols., 2001] y antioxidante [Scartezzini y Speroni, 2000].

Los efectos biológicos atribuidos a M. indica están relacionados con la presencia de importantes compuestos en proporciones variables en cada parte del árbol. Los polifenoles constituyen uno de los componentes fundamentales y mayoritarios. Entre ellos se incluyen xantonas como mangiferina, isomangiferina y homomangiferina, flavonoides como quercetina, isoquercetina y catequina, taninos como el ácido gálico, metilgalato, galotanino y otros. Se reporta además la presencia de triterpenos, β -sitosterol, vitamina A y C, entre otros compuestos [Anjaneyulu y cols., 1999; Scartezzini y Speroni, 2000]. La mangiferina, uno de los componentes mayoritarios de los extractos obtenidos de M. indica, posee actividad inmunomoduladora, antitumoral, antiviral, hipoglicemiante y antioxidante [Guha y cols., 1996; Yoosook y cols., 2000; Miura y cols., 2001; Scartezzini y Speroni, 2000].

1.8.1 Extracto acuoso de la corteza de Mangifera indica L.

A partir del conocimiento etnomédico en Cuba de la utilización de la especie M. indica para el tratamiento de diversas patologías como la artritis, el lupus eritematoso sistémico, el asma y algunos tipos de neoplasias [Guevara y cols., 2002; Tamayo y cols., 2001], el Centro de Química Farmacéutica (CQF) ha desarrollado un nuevo producto obtenido de la corteza de M. indica, comercializado bajo la Marca Registrada VIMANG[®]. Este producto es un extracto acuoso obtenido por decocción, que contiene una rica mezcla de polifenoles, terpenoides, ácidos grasos, azúcares, polialcoholes y microelementos (Tabla 3) y cuyo componente mayoritario es la mangiferina [Núñez-Sellés y cols., 2002]. Los estudios farmacológicos han demostrado que este extracto posee actividad antioxidante y anti-inflamatoria [Martínez y cols, 2000; 2001a, b; Garrido y cols., 2001; 2004 a,b; 2005; 2006].

La evaluación de las propiedades antioxidantes del extracto demostró: a) un elevado poder antioxidante in vitro, evidenciado por su capacidad de secuestrar radicales libres, inhibir la

peroxidación de fosfolípidos, proteger del daño oxidativo y la ausencia de efecto pro-oxidante sobre el ADN bajo condiciones experimentales específicas [Martínez y cols, 2000]; b) capacidad protectora contra el daño oxidativo inducido por productos pro-oxidantes en suero, hígado y cerebro; así como inhibición de la superproducción de ERO por macrófagos peritoneales de ratón, efectos superiores en todos los casos a los obtenidos con vitaminas C, E y β caroteno [Sánchez y cols., 2000]; c) efecto inhibitorio sobre la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos y protección al daño oxidativo a proteínas [Martínez y cols., 2001a]; d) capacidad protectora del daño oxidativo en células piramidales de hipocampo y hepatocitos, mediante modelos de isquemia-reperusión cerebral y hepática [Martínez y cols., 2001b; 2003]

La acción anti-inflamatoria del extracto de *M. indica* se demostró in vivo por la reducción del edema plantar inducido por carragenina y la inhibición de la producción de $TNF\alpha$ y NO en modelos de choque endotóxico. Además, experimentos in vitro demostraron su capacidad de inhibir la producción de PGE_2 y LTB_4 , la actividad de la enzima fosfolipasa A2 de secreción y la activación de $NF\kappa B$ mediada por $TNF\alpha$ [Garrido y cols., 2001; 2004 a,b; 2005].

Los estudios toxicológicos realizados al extracto de *M. indica* demostraron que no posee efectos tóxicos por vía oral ni tópica. Por vía intraperitoneal en ensayos de toxicidad aguda en ratones OF1 se evidenciaron algunos signos tóxicos, con una dosis letal media (DL_{50}) de 273 mg/kg para las hembras y 219 mg/kg para los machos, mientras que en ratas Srague Dawley la DL_{50} fue de 500 mg/kg para los machos y 166,48 mg/kg para las hembras, lo que evidenció diferencias en la susceptibilidad entre los sexos. Por vía oral no presentó efectos tóxicos a 2 g/kg en administración aguda, subcrónica y crónica y tampoco se demostraron efectos mutagénicos, clastogénicos ni teratogénicos [Garrido y cols., 1998; Gámez y cols., 2001, 2002; Rodríguez y cols., 2002].

Tabla 3. Composición cuali y cuantitativa del extracto estandarizado de la corteza de *M. indica* obtenido en el Centro de Química Farmacéutica.

Grupo	Componentes	Contenido (%)	Grupo	Componentes	Contenido (%)
Polifenoles (40 – 60 %)	Mangiferina	10 – 20	Terpenoides (10 – 20 %)	Ácido mangiferónico	10 – 15
	(+) Catequina	7 – 10		Beta-elemeno	2 – 5
	(-) Epicatequina	4 – 7		Alfa-guaieno	2 – 5
	Ácido gálico, propil éster	2 – 5		Aromandrenol	2 – 5
	Ácido gálico, metil éster	2 – 5		Hinesol	1 – 3
	Ácido benzoico, propil éster	2 – 5		Cicloartanoles	1 – 3
	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	1 – 3		Ledol	1 – 2
	Ácido benzoico	1 – 2		Taraxerol	1 – 2
Azúcares (3 – 6 %)	Galactosa	2 – 5	Polialcoholes (2 – 5 %)	Sorbitol	2 – 4
	Glucosa	1 – 3		Mioinositol	1 – 2
	Arabinosa	1 – 3		Xilitol	0,5 - 1
Ácidos grasos (1-5%)	Mirístico	0,1 – 3,0	Microelementos (1 – 3 %)	Potasio	0,8 – 1,0
	Palmitico	0,3 – 0,4		Calcio	0,2 – 0,4
	Linoleico	0,15 – 0,35		Magnesio	0,1 – 0,2
	Oleico	0,2 – 0,4		Hierro	0,1 – 0,2
	Estearico	0,1 – 0,2		Cobre	≤ 0,01
	Eicosatrienoico	0,1 – 0,3		Zinc	≤ 0,01
			Selenio	0,03– 0,08	

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención del extracto estandarizado de la corteza de M. indica y de la mangiferina

El extracto de la corteza del árbol M. indica se obtiene por decocción durante una hora en agua, después se concentra por evaporación y se seca por atomización para obtener un polvo fino de color carmelita [Núñez-Sellés y cols, 2002]. Adjunto a la muestra, codificada como QF-808 (lote 112), se recibió el informe No. de folio 844 en el cual el servicio analítico del CQF certificó la calidad de la misma.

La mangiferina (2-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetra-hidroxi-9H-xanten-9-ona) se obtiene mediante extracción con metanol del extracto estandarizado de la corteza del árbol de M. indica, con una pureza de 88,5 % comparada con un patrón de mangiferina (Sigma, EUA) por métodos espectroscópicos [Núñez-Sellés y cols., 2002]. Adjunto a la muestra, se recibió el informe No. de folio 084 en el cual el servicio analítico del CQF certificó la calidad del lote III utilizado para la experimentación.

Con el propósito de demostrar si la presencia de mangiferina está involucrada en los efectos del extracto, se evaluó en cada experimento al menos una dosis o concentración de mangiferina. En caso de utilizarse solo una dosis o concentración de mangiferina, esta se corresponde con la dosis o concentración que equivale a la cantidad de mangiferina presente en la mayor dosis o concentración utilizada del extracto de M. indica para el mismo experimento, considerando un 10 % de mangiferina en el extracto.

El rango de dosis (hasta 500 mg/kg) y concentraciones (hasta 400 µg/mL) utilizadas del extracto se seleccionó en base a las dosis y concentraciones para las cuales se ha demostrado efecto antioxidante y anti-inflamatorio [Martínez y cols, 2000; 2003; Sánchez y cols., 2000; Garrido y cols., 2001; 2004 a,b; 2005; 2006].

En los estudios farmacológicos in vivo, las diferentes dosis del extracto y la mangiferina se disolvieron en agua destilada o disolución salina. Las muestras se prepararon al momento de la administración. En los estudios in vitro, ambos productos se disolvieron en el medio de cultivo celular con 0,4% de dimetilsulfóxido (DMSO) para garantizar total solubilidad. En cada ensayo, se evaluó el efecto del vehículo utilizado para la disolución de los productos.

2.2. Consideraciones bioéticas

Toda la experimentación realizada con animales de laboratorio en el presente trabajo estuvo sujeta al más estricto cumplimiento de las normas éticas en la experimentación animal, regidas por guías éticas para la investigación con animales de laboratorio [Olfert y cols., 1993].

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética y el Departamento de Control de la Calidad de la institución en la que se realizó la investigación: la Universidad de Santiago de Compostela en España y el Centro de Química Farmacéutica de La Habana.

2.3. Evaluación del efecto inmunomodulador del extracto de M. indica y mangiferina en la funcionalidad de macrófagos peritoneales

En estos experimentos se utilizaron ratas Wistar (machos, 180-200 g) y ratones Balb/c (machos, 18-22 g), proporcionados por la empresa Criffa (España), adaptados durante siete días a las condiciones del laboratorio. Los animales se colocaron en grupos de cinco en cajas de Macrolon (Panlab, España), se mantuvieron con humedad y temperatura controlada entre 22-24 °C, sistema de doce horas de luz y doce de oscuridad y una dieta EMO 1001 establecida para los animales de laboratorio.

Obtención de los macrófagos peritoneales de ratas para los ensayos in vitro

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical en una cámara de flujo laminar. El abdomen se desinfectó con alcohol 70 % y se administró por vía intraperitoneal (i.p) 30 mL de disolución salina balanceada de Hank (DSBH). Después de dar ligeros masajes abdominales, se extrajeron aproximadamente 30 mL de fluido peritoneal. La suspensión celular se lavó por centrifugación a 400 xg durante 10 minutos a 4 °C, se resuspendió en DSBH y se ajustó la concentración celular a 10⁶ células/mL. La proporción de macrófagos en la población celular peritoneal total se determinó por la tinción con α -naftil, mediante la cual se evalúa la actividad enzimática esterasa inespecífica característica del sistema mononuclear fagocítico [Ennist y Jones, 1983]. Se demostró que más del 96% de las células de la suspensión celular peritoneal eran macrófagos.

2.3.1. Ensayo de citotoxicidad celular

Para descartar la posibilidad de un efecto tóxico del extracto de *M. indica* o la mangiferina sobre la viabilidad celular de los macrófagos de ratas, se desarrolló un ensayo de citotoxicidad por reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; Sigma, EUA) [Woerdenbag y cols., 1994] y se evaluaron concentraciones del extracto de *M. indica* y mangiferina entre 0,1-1000 μ g/mL durante 48 horas. Los resultados se expresaron como % de viabilidad celular.

2.3.2. Ensayo in vivo de quimiotaxis celular

En este ensayo se conformaron grupos experimental de ocho ratas Wistar. Para inducir una respuesta quimiotáctica hacia el peritoneo de las ratas, se inyectó por vía i.p un mL de tioglicolato 3 % (Merck, Alemania) e inmediatamente se administró 0,5 mL del extracto de *M. indica* o mangiferina en dosis única i.p de 10, 50, 100 y 150 mg/kg en disolución salina NaCl

0,9 % según correspondía a cada grupo experimental. El grupo control recibió disolución salina i.p. A los cinco días se recogió el exudado peritoneal, se contó en un hemocitómetro el número total de células y se determinó además la proporción de macrófagos en esta suspensión por la tinción con α -naftil [Ennist y Jones, 1983].

2.3.3. Ensayo in vitro para determinar actividad fagocítica

La actividad fagocítica de macrófagos se evaluó por el método fluorimétrico basado en la utilización de levaduras (*Kluyveromyces lactis*) marcadas con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) [Oda y Maeda, 1986]. Alícuotas de 100 μ L de la suspensión celular de macrófagos residentes (10^6 células/mL) obtenidas como se describió en la sección 2.3. se adicionaron en placas de 96 pozos (Corning, EUA) y se colocaron en incubadora a 37°C y 5 % CO₂ para adherencia. Las células no adherentes se eliminaron por lavado con DSTF. Posteriormente, se adicionaron alícuotas de 100 μ L de DMEM, 5×10^7 células de levaduras marcadas con ITCF y la concentración correspondiente del extracto de M. indica o mangiferina (0,1, 1, 10, 50, 100, 200 μ g/mL), resveratrol (100 μ M \approx 25 μ g/mL) o el DMSO 0,4% utilizado como vehículo y se incubó durante 140 minutos a 37 °C y 5 % CO₂. Después se lavaron las células varias veces con DSTF y se solubilizaron por adición de 100 μ L por pocillo de Tris-HCl 25 mM pH 8,5 conteniendo 0,2 % de duodecilsulfato de sodio. La fluorescencia se determinó en un lector de fluorescencia (Bio-Tek Instruments, RU) con excitación a 490 nm y medición a 525 nm. En este experimento se empleó como referencia el resveratrol, un polifenol de origen natural capaz de disminuir la actividad fagocítica de macrófagos [Leiro y cols., 2002]. De cada condición experimental se realizaron cuatro réplicas.

2.3.4. Ensayo in vitro para la determinación de la producción de óxido nítrico

La producción de NO por los macrófagos peritoneales se determinó mediante la reacción de Griess, por medición de la cantidad total de nitritos en el sobrenadante de cultivo. El NO que se forma in vitro como resultado de la acción de la enzima NOS-2 experimenta una rápida oxidación a nitritos, por lo que la determinación de estos últimos constituye una vía indirecta para evaluar la producción de NO [Jun y cols., 1994].

Alicuotas de 100 μ L de la suspensión de macrófagos residentes (10^6 células/mL) obtenidas como se describió en la sección 2.3 se incubaron en placas de 96 pozos (Corning, EUA) a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 90 minutos. Después de la adhesión, las células se lavaron cuidadosamente con DSBH para eliminar células no adherentes y se incubaron durante 48 horas con 100 μ L de medio de cultivo DMEM conteniendo 100 ng/mL de LPS, 10 unidades (U)/mL de IFN γ murino y el extracto de M. indica o la mangiferina a concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 μ g/mL. Se utilizó el N-monometil-L-arginina (L-NMMA, 250 μ M) como control de la inhibición de la producción de NO y el resveratrol (100 μ M \approx 25 μ g/mL) como polifenol de conocida actividad inhibitoria sobre este parámetro [Miura y cols., 2000; Leiro y cols., 2002]. Al término de la incubación, se recogieron alicuotas de 100 μ L de cada sobrenadante de cultivo y se incubaron con igual volumen de reactivo de Griess (sulfanilamida 1 % y N-(1-naftil)etilendiamina 0,1 % en ácido fosfórico 2,5 %), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la absorbancia a 530 nm en un lector de placas de microtitulación (Titertek Multiscan, Finlandia). La concentración de nitritos se calculó con referencia a una curva patrón obtenida con NaNO₂ en concentraciones entre 1-200 μ M. De cada condición experimental se realizaron cuatro réplicas

2.3.5. Determinación de la expresión de genes que codifican para enzimas, citocinas y factores de transcripción relacionados con la respuesta inmune

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos por los cuales el extracto de *M. indica* modula algunas de las funciones de los macrófagos, se evaluaron sus efectos *in vitro* a nivel molecular en la expresión de determinadas proteínas producidas por estas células, utilizando ratones Balb/c como fuente de macrófagos peritoneales.

En los experimentos que se describen a continuación se amplió el intervalo de concentraciones hasta 400 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de *M. indica*, debido a era interés trabajar a una concentración del extracto que fuera equivalente a 40 $\mu\text{g/mL}$ de mangiferina, considerando que este polifenol tiene una composición aproximada de un 10% en el extracto. El interés de incluir esta concentración del extracto de 400 $\mu\text{g/mL}$ se debe a que Leiro y cols., 2003, demostraron algunas propiedades inmunomoduladoras de la mangiferina a la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$. Uno de los objetivos de este trabajo es precisamente determinar si la mangiferina está involucrada en los efectos farmacológicos del extracto, por tanto, para alcanzar con el extracto una concentración de mangiferina equivalente a 100 μM ($\approx 40 \mu\text{g/mL}$) se requieren 400 $\mu\text{g/mL}$.

Obtención y activación de macrófagos peritoneales murinos

Para la obtención de los macrófagos peritoneales murinos, los ratones Balb/c se inyectaron i.p con 0,5 mL de tioglicolato 3 % y tres días después se obtuvo el exudado peritoneal. En condiciones asépticas, el abdomen de cada ratón se desinfectó, se inyectaron cinco mL de medio de cultivo DMEM en la cavidad peritoneal y después de un ligero masaje abdominal, se extrajeron aproximadamente tres mL de fluido peritoneal y se transfirieron a un tubo de 10 mL en hielo. Las células se lavaron por centrifugación a 400 $\times g$ y se contaron en un

hemocitómetro para ajustar la concentración a 10^6 células/mL. El número de células viables se determinó por tinción de exclusión con tripán azul. La proporción de macrófagos en el exudado peritoneal se estimó por determinación de la actividad esterasa no específica [Ennist y Jones, 1983], evidenciándose más de un 98 % de macrófagos. Alícuotas de 1000 μ L de la suspensión celular se adicionaron en placas de seis pozos (Sterilin, RU) y se incubaron por 90 minutos a 37 °C y 5 % CO₂ para favorecer la adhesión.

2.3.5.1. Determinación de los niveles de ARNm de NOS-2, COX-1, COX-2, NFkB e IkB por reacción de reverso transcripción y de la polimerasa en cadena (RT-PCR)

Alícuotas de 1000 μ L de la suspensión celular de macrófagos peritoneales murinos obtenidos como se describió en la sección 2.3.5 se incubaron durante dos horas a 37°C en medio de cultivo DMEM con 10 U/mL de IFN γ , 100 ng/mL de LPS y concentraciones del extracto de M. indica (4, 40 y 400 μ g/mL) o dexametasona (100 μ M = 40 μ g/mL) como fármaco de referencia.

El aislamiento del ARN total (ARNt) de las muestras de macrófagos se realizó con una disolución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (TriPure Isolation Reagent, Roche, Alemania). Se adicionó un mL de TriPure en cada pozo (área 10 cm²) y las células se lisaron haciendo pasar varias veces la suspensión celular por la punta de la pipeta. El lisado celular se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteínas. Seguidamente se adicionaron 0,2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos y se centrifugó a 12 000 xg durante 15 minutos a 4 °C. La fase superior incolora se removió y el ARNt presente en la fase inferior se precipitó con isopropanol. El precipitado resultante de ARNt se secó y disolvió en agua libre de ARNasa tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) a

concentración de 1 µg/mL. Para comprobar la calidad del ARNt aislado, se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 2%.

Posteriormente se procedió a la transcripción reversa del ARNt en ADN complementario (ADNc). La síntesis del ADNc (25 µL/reacción) se realizó por utilización de hexámeros cebadores aleatorios 1,25 µM (Roche, Alemania), 250 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs), 10 mM de ditionitrotol (DTT), 20 U de inhibidor de ARNasa, 2,5 mM de MgCl₂, 200 U de reverso transcriptasa del virus de leucemia murino (Promega, EUA) en disolución tamponada de reacción (Tris 30 mM y KCl 20 mM, pH 8,3) y 2 µg de muestra de ARNt. Los parámetros cíclicos para la reacción de reverso transcripción fueron: hibridización durante 10 minutos a 25 °C y reverso transcripción por 60 minutos a 42 °C.

Un microlitro de la mezcla de reacción anterior se utilizó para realizar reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés polymerase chain reaction) y se utilizaron los siguientes pares de cebadores ratón específicos, del Banco de Genes del Centro Nacional de Biotecnología e Información de España: NOS-2 (5'-TGGAAGCCGTAACAAAGGAAA-3'; 5'-ACCACTCGTACTTGGGATGCT-3'); COX-1 (5'-TGGTGGATGCCTTCTCTCG-3'; 5'-AACAGATGGGATTCCCTAGGA-3'); COX-2 (5'-TGATCGAAGACTACGTGCAAC-3'; 5'-TCATCTCTCTGCTCTGGTCAA-3'); NF-kB (5'-TAATCCTTGGGAGTGGAGCAA-3'; 5'-TGTTGGAGTGTGGCTGGAGT-3'); IκB (5'-ATTGCTGAGGCACTTCTGAA-3'; 5'-TTGACATCAGCACCCAAAGT-3'); GADPH (5'-ACCGCATCTTCTTGTGCAGT-3'; 5'-GCCAAAGTTGTCATGGATGA-3').

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µL de mezcla de reacción optimizada que contenían disolución tamponada (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, pH 9,0), 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador (tanto el cebador con sentido como el

antisentido), 1,5 unidades de rTaq ADN polimerasa (Roche, Alemania) y 1 μ L de los productos de la reacción de reverso transcripción. El ciclo térmico utilizado en un ciclador térmico automático (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Norwalk, EUA) fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante cinco minutos seguida de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, ciclos de 55 °C para NOS-2, COX-1, COX-2, NF-kB e I κ B o de 53 °C para GAPDH por 45 segundos y 72 °C por un minuto y finalmente una fase de extensión de siete minutos a 72 °C. En todos los experimentos se evaluaron controles sin ARN o sin reverso transcriptasa y en ningún caso se obtuvieron productos de amplificación.

Los productos de la PCR (alícuotas de 20 μ L) se separaron en un gel de agarosa 2 % en disolución tamponada TBE (Tris base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 0,02 M, pH 8,0), se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 μ g/mL y se fotografiaron con una cámara digital bajo un transluminador UV de intensidad variable Spectroline 312 como se describe en [Leiro y cols., 2000]. La cantidad de ADNc de cada banda electroforética se cuantificó con un programa de análisis densitométrico (Image Master Total Lab, Amersham Pharmacia Biotech, RU), expresado con respecto a la cantidad de ADNc en la banda correspondiente al gen control GAPDH en el mismo gel.

2.3.5.2. Determinación de la expresión de las enzimas NOS-2 y COX-2 mediante el ensayo de slot-blot

Los cultivos de macrófagos peritoneales inflamatorios murinos (10^6 células/mL) obtenidos como se describió en la sección 2.3.5. se incubaron durante seis horas en medio de cultivo DMEM con 10 U/mL de IFN γ , 100 ng/mL de LPS, el extracto de M. indica (4, 40 o 400 μ g/mL), mangiferina 40 μ g/mL o sin productos (controles) a 37°C y 5 % CO $_2$. Las células se lavaron con disolución tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M; pH 7.4) y se resuspendieron

en 0,4 mL de TBS y 0,1 mL de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma, EUA). Las células se sonicaron en hielo a 60 W por 15 segundos y se centrifugaron durante cinco minutos a 13 000 xg. La concentración de proteínas totales en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford [Kruger, 1994] con albúmina de suero bovina (ASB) como patrón de referencia. Iguales cantidades de proteína total (60 µg en 100 µL) se transfirieron a membranas hidrofóbicas de polivinilideno difluoruro (PVDF, Hybond-P, Amersham Biosciences, RU) utilizando una filtración múltiple tipo slot-blot (Amersham Biosciences, RU). Las membranas se incubaron con leche descremada 5% en TBS con 0,2% Tween 20 durante una hora para bloquear las uniones inespecíficas. La expresión de las enzimas NOS-2 y COX-2 fueron inmunodetectadas por incubación durante una hora a temperatura ambiente con un antisuero policlonal de conejo contra NOS-2 (Alpha Diagnostic Internationa, EUA) o COX-2 murino (Cayman Chemical Co, EUA) diluido 1:1000 en disolución de dilución (TBS con 0,05 % Tween 20 y 1 % de leche descremada). Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron cinco veces con disolución de lavado (TBS con 0,05 % Tween 20), se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una dilución 1:3000 en disolución de dilución del anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences, RU) y posteriormente se lavaron cinco veces con disolución de lavado. Finalmente, los anticuerpos unidos se visualizaron por quimioluminiscencia con un filme autorradiográfico siguiendo las instrucciones del suministrador (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, RU). El análisis densitométrico se realizó con un escaner láser y las bandas se cuantificaron en imágenes TIF en un programa de análisis densitométrico (ImageMaster Total Lab, Amersham Biosciences, RU), con péptido murino NOS-2 (un péptido de 19 aminoácidos de secuencia designada INOS22-P; péptido

control; 1125-1144 aa; Alpha Diagnostic Internacional, EUA) o COX-2 ovina (Cayman Chemical Co, EUA) como referencia.

2.3.5.3. Determinación de los niveles de ARNm de TNF α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF y TGF β por reacción de reverso transcripción y reacción múltiple de la polimerasa en cadena (RT-MPCR)

Las condiciones experimentales son las mismas de la sección 2.3.5.1 en cuanto a la estimulación de los macrófagos, los tratamientos y la obtención del ADNc celular.

El ADNc obtenido en el paso de reverso transcripción descrito en 2.3.5.1 fue aclarado por extracción en fenol y precipitación en etanol. La amplificación del cADN se realizó por múltiple PCR (MPCR) utilizando un estuche reactivo CytoXpressTM (Biosource Internacional, EUA), siguiendo las instrucciones del productor descritas en [Korhonen y cols., 2002], el cual está diseñado para dirigir la amplificación simultánea de regiones de marco abierto de lectura de al menos seis genes de ratón en una misma muestra: GAPDH, GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6 y TGF β .

La PCR múltiple se realizó en un volumen de 50 μ L que contenían 10,5 μ L de agua destilada, 10 μ L de disolución tamponada 10x provista por el comercializador para MPCR, 5 μ L de los distintos cebadores 10x para los genes que se amplifican, 4 μ L de cada dNTP (3,12 mM), 0,5 μ L de rTaq ADN polimerasa (5 U/ μ L) (Roche, Alemania) y 20 μ L del ADNc purificado. El ciclo térmico fue el siguiente: desnaturalización inicial a 96 °C durante un minuto, dos ciclos con un paso de desnaturalización a 96 °C durante un minuto e hibridación a 60 °C durante cuatro minutos, luego 33 ciclos a 94 °C durante un minuto y 60 °C durante 2,5 minutos.

Los productos de la MPCR (alícuotas de 10 μ L) se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2 % y se tiñeron con bromuro de etidio. El gel se fotografió con una cámara digital

bajo transiluminación UV y las bandas se cuantificaron en imágenes TIF en un programa de análisis densitométrico (ImageMaster Total Lab, Amersham Pharmacia Biotech, RU), con respecto a la cantidad de ADNc en la banda correspondiente al gen control GAPDH en el mismo gel.

2.3.5.4. Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de TNF α

Para comprobar que la inhibición del ARNm se corresponde con la inhibición de la expresión proteica del TNF α , se determinó la concentración de esta citocina en el sobrenadante de cultivo celular. Alícuotas de 100 μ L de la suspensión celular de macrófagos (10^6 células/mL) se incubaron en placas de cultivo de 96 pozos a 37 °C bajo 5 % CO₂ durante seis horas con LPS 100 ng/mL e IFN γ 10 U/mL en DMEM, con las diferentes concentraciones del extracto de M. indica o dexametasona (4, 40 o 400 μ g/mL) o sin productos (controles) (de cada condición experimental se realizaron cuatro réplicas). Luego, las placas se centrifugaron a 400 xg durante cinco minutos y el TNF α se cuantificó en el sobrenadante mediante un ensayo inmunoenzimático de tipo captura (R & D Systems, EUA). Las placas de microtitulación (Costar, EUA) se recubrieron por incubación durante 12 horas a temperatura ambiente con 100 μ L por pozo de anticuerpo captura (anti-TNF α murino obtenido en cabra) a 0,8 μ g/mL en DSTF. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con disolución de lavado (0,05 % Tween 20 en DSTF, pH 7,2-7,4), se bloquearon por adición de 300 μ L por pozo de disolución de bloqueo (ASB 1 %, sucrosa 5 % DSTF con 0,05 % de azida sódica) y se incubaron durante dos horas a 37 °C. Después de cinco pasos de lavados y de la adición de 100 μ L de sobrenadante de cultivo o disolución estándar de TNF α (siete diluciones seriadas 1:2 de una disolución madre de 2000 pg/mL de TNF α recombinante de ratón en reactivo diluyente DSTF

conteniendo 1% ASB, pH 7,2-7,4), las placas se incubaron por dos horas con anticuerpo de detección (anti-TNF α murino biotinilado obtenido en cabra, 300 ng/mL en reactivo diluyente). Las placas se lavaron nuevamente cinco veces con disolución de lavado, se adicionaron 100 μ L de una dilución 1: 200 de peroxidasa de rábano picante combinada con estreptoavidina y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con disolución de lavado, la actividad peroxidasa se detectó por adición de 100 μ L de sustrato o-fenilendiamina a concentración de 0,04 % en disolución tampón fosfato-citrato (pH 5,0) conteniendo H₂O₂ al 0,001 %. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo por adición de 25 μ L de H₂SO₄ 3 N y la densidad óptica se determinó a 492 nm en un lector de placas de microtitulación (Titertek Multiscan, Finlandia).

2.4. Evaluación del efecto del extracto de M. indica y la mangiferina en la respuesta alérgica

Para estos experimentos, se utilizaron ratones Balb/c, hembras (18-20 g) y ratas Wistar (machos, 220-250 g), procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, Cuba). Los animales se colocaron en grupos de 10 en cajas de macrolon (Panlab, España) en un local apropiado con ciclos de luz de 12 horas y temperatura de 22-24 °C, tuvieron libre acceso al agua y a la comida y se mantuvieron en estas condiciones una semana antes de los experimentos.

2.4.1. Modelo in vivo de inflamación alérgica

2.4.1.1. Inmunización de los animales y tratamientos

Para el desarrollo de este modelo experimental se conformaron siete grupos experimentales de ocho ratones Balb/c. Seis grupos se inmunizaron i.p siete veces en días alternos con 10 μ g de OVA en 0,5 mL de disolución salina fisiológica. El grupo no inmunizado recibió inyecciones

con disolución salina fisiológica. Tres semanas después de la última inmunización, comenzaron a recibir durante siete días en una administración diaria, tratamiento p.o con el extracto de *M. indica* (50, 100, 250, 500 mg/kg), mangiferina (50 mg/kg) o indometacina 5 mg/kg según correspondía a cada grupo. La administración oral se realizó siguiendo una relación peso volumen de 10 mL/kg de peso. El grupo control recibió agua destilada. Al término del tratamiento (cuatro semanas después de la última inmunización), se procedió a la inducción de la respuesta alérgica inflamatoria mediante el modelo de edema plantar inducido por OVA y a la determinación de la respuesta proliferativa de los esplenocitos a la OVA.

2.4.1.2. Edema plantar inducido por OVA

Inicialmente comprobamos que dosis únicas por vía oral del extracto y la mangiferina en el mismo rango de dosis y en este mismo modelo no presentan efecto inhibitorio significativo (datos no mostrados). Esto nos permitió poder realizar el edema plantar una hora después de la última administración del extracto después de siete días de tratamiento.

Por tanto, una hora después de la última administración de los productos (séptimo día de tratamiento), se administró en la aponeurosis plantar derecha de cada animal, 100 μ L de una disolución de OVA de 100 μ g/mL, lo que significó administrar 10 μ g/animal. En la aponeurosis plantar izquierda de cada animal, se administraron 100 μ L de disolución salina fisiológica. Una hora después, los animales se sacrificaron bajo atmósfera de éter etílico, las patas se amputaron a nivel de la rodilla y se pesaron en balanza analítica. Los resultados se expresaron mediante el índice de edema, como la diferencia de peso entre la pata derecha y la pata izquierda y se determinó el % de inhibición de la respuesta alérgica inflamatoria [Mi-Sun y cols., 2003].

2.4.1.3. Ensayo de proliferación linfocitaria en respuesta a la estimulación con OVA

Una vez sacrificados los animales, se desinfectaron con alcohol etílico al 95 % y se introdujeron en una bandeja estéril dentro de flujo laminar para extraer los bazo y obtener los esplenocitos bajo condiciones de esterilidad. Los esplenocitos de los animales correspondientes a cada grupo experimental tratados con diferentes dosis del extracto o mangiferina se obtuvieron por gradiente de centrifugación en Histopaque (Sigma, EUA) y cada suspensión celular se ajustó a una concentración de 2×10^6 células/mL. Los esplenocitos se sembraron en placas de 96 pozos (Corning) y se cultivaron durante 72 horas en incubadora de 5 % de CO₂ a 37 °C en presencia de OVA (10 µg/mL). La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico basado en la reducción del MTT a formazán [Youl y cols., 1999]. Cuatro horas antes de terminado el período de incubación, se adicionaron 15 µL por pocillo de una disolución de MTT 5 mg/mL y se continuó el cultivo en similares condiciones de incubación. Al término de esta, se retiró el medio de cultivo al vacío y se adicionaron 100 µL de DMSO para la disolución del formazán formado y posteriormente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro [PR521SUMA, Cuba] a 546 nm.

2.4.2. Reacción cutánea inducida por histamina en ratas

Para la evaluación del efecto sobre el incremento de permeabilidad capilar inducido en la reacción cutánea a la histamina, se conformaron seis grupos experimentales de ocho ratas Wistar que recibieron tratamiento v.o durante siete días en una administración diaria con el extracto de *M. indica* (50, 100, 250 y 500 mg/kg), mangiferina (50 mg/kg) o prometazina (25 mg/kg) según correspondía. La administración oral se realizó siguiendo una relación peso volumen de 10 mL/kg de peso. Transcurridas diez horas de la última administración, las ratas se depilaron en la región dorsal donde se dibujaron seis cuadrantes de 1 x 1 cm. Seguidamente

se administró i.v un mL de Azul de Evans (20 mg/kg) e inmediatamente después se inyectaron i.d 100 μ L de disolución salina con 50 μ g de histamina (Sigma, EUA) en cuatro de los cuadrantes. En los dos cuadrantes restantes se inyectaron 100 μ L de disolución salina fisiológica. Después de treinta minutos de la administración de la histamina se sacrificaron los animales, se recortaron las porciones de piel y se colocaron en tubos de ensayo con dos mL de formamida, los cuales se incubaron a 37°C durante 48 horas y se determinó la densidad óptica del colorante extravasado en un espectrofotómetro a 620 nm (Pharmacia, LKB UltrospecPlus) [Abe y cols., 1994]. Se determinó la cantidad de colorante extravasado producto del incremento de permeabilidad inducido por la histamina, como la diferencia de absorbancia entre los cuadrantes con histamina y con disolución salina en cada animal. Se calculó para cada tratamiento el % de inhibición de la reacción cutánea inducida por histamina.

2.4.3. Ensayo para la determinación in vitro de la liberación de histamina inducida por el compuesto 48/80 en mastocitos peritoneales de ratas

Los mastocitos peritoneales se obtuvieron de ratas Wistar. El abdomen de la rata se desinfectó con alcohol 70 % y se administraron i.p 20 mL de disolución Tyrode (NaCl, 137 mM; NaHCO₃, 12Mm; NaH₂PO₄, 0,3 mM, KCl, 2,7 mM, MgCl₂, 1 mM; CaCl₂, 1,8 mM; dextrosa, 5,6 mM). Después de dar ligeros masajes abdominales, se extrajeron aproximadamente 20 mL de fluido peritoneal que se transfirieron a un tubo de propileno en hielo. El lavado peritoneal se centrifugó a 250 xg por cinco minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en un mL de disolución Tyrode fría. Los mastocitos se separaron de los demás tipos celulares según el método descrito por Yurt y cols., 1977. Para ello, a la suspensión celular se le adicionó un mL de metrizamina 22,5 % (densidad 1,120 g/mL) y se centrifugó a temperatura ambiente a 400 xg durante 15 minutos. Las células de la interfase se aspiraron y

descartaron y el precipitado celular se lavó varias veces y se resuspendió en un mL de disolución Tyrode. Más del 95% de las células así obtenidas eran mastocitos, determinado por tinción con azul de toluidina. Más del 96 % de las células fueron viables, determinado por tinción con tripán azul. Se realizó un ensayo de citotoxicidad celular por MTT para demostrar que las concentraciones del extracto y mangiferina utilizadas no resultaran citotóxicas para los mastocitos.

Alícuotas de un mL de la suspensión celular (por triplicado) se incubaron a 37 °C durante 10 minutos con tres concentraciones diferentes del extracto de *M. indica* y mangiferina (50, 100 o 250 µg/mL) o cromoglicato sódico (100 µg/mL) y seguidamente las células se incubaron durante cinco minutos con el compuesto 48/80 (1 µg/mL), un inductor de la desgranulación mastocitaria. Al término de la incubación, los tubos se colocaron en hielo para detener la reacción. Cada muestra se centrifugó a 250 xg durante cinco minutos, se colectó el sobrenadante para la determinación de la histamina liberada y el precipitado celular se resuspendió en un mL de disolución Tyrode y se calentó a 100 °C durante 10 minutos para la liberación de la histamina residual [Remírez y cols., 2002].

La histamina liberada y la residual se determinaron fluorimétricamente a 440 nm (excitación a 360 nm) en un espectrofluorímetro (Shimadzu, Japón, RF-5000). Para ello, se adicionaron en el momento de la lectura, 400 µL de NaOH 1N y 100 µL de ortoortaldehído (10 mg/mL), se esperaron cuatro minutos, se adicionaron 200 µL de HCl 3N y se procedió a la determinación fluorimétrica [Yi y cols., 2001]. Se construyó una curva de calibración con concentraciones de histamina entre 0,1 y 100 µM. Los resultados se expresan como concentración de histamina liberada en cada condición experimental.

2.4.4. Ensayo para determinar IgE específica

2.4.4.1. Tratamientos y obtención del antisuero de los ratones

Para esta evaluación se conformaron seis grupos experimentales de ocho ratones Balb/c, los cuales se inmunizaron i.p con ovoalbúmina (OVA, Sigma, EUA) preparada en una disolución inmunizante reportada por Ovary en 1986. Después de la inmunización y diariamente durante 21 días, los ratones recibieron tratamiento p.o una vez al día con el extracto de *M. indica* (50, 100, 250 y 500 mg/kg), mangiferina (50 mg/kg) o ketotifeno (3 mg/kg) según correspondía. El grupo control recibió agua destilada. La administración oral se realizó siguiendo una relación peso volumen de 10 mL/kg de peso. A los siete días se reinmunizaron los animales de forma similar a la primera inmunización. Transcurridos 21 días de la primera inmunización, se realizó una extracción de sangre del plexo retro-orbital de los ratones. La sangre se depositó en tubos de ensayo, se dejó reposar durante seis horas, se centrifugó a 400 xg por 10 minutos, se extrajo el suero y se almacenó a -70°C para su conservación hasta su posterior utilización.

2.4.4.2. Prueba de anafilaxia pasiva cutánea para determinar IgE específica

Para estimar los niveles de IgE específica en el suero de los ratones inmunizados con OVA, se realizaron pruebas de anafilaxia pasiva cutánea (APC) en ratas Wistar con el antisuero obtenido en ratones inmunizados con OVA y tratados con el extracto de *M. indica*, mangiferina o ketotifeno [Yamamura y cols., 1991]. En la prueba de APC se evaluaron cuatro diluciones seriadas (1/64, 1/128, 1/256 y 1/512) de los antisueros de ratón obtenidos como se describió en la sección 2.4.4.1. Las ratas se depilaron en la región dorsal 24 horas antes de comenzar el experimento y se sensibilizaron por administración intradérmica (i.d) de 100 μL de las diferentes diluciones del antisuero de ratón correspondiente en DSTF. En cada rata, se inyectaron dos réplicas a ambos lados de la línea media del lomo de cada dilución del

antisuero del grupo control y dos réplicas de cada dilución del antisuero de un grupo con tratamiento. Para la evaluación del antisuero de cada grupo se utilizaron cinco ratas. Transcurridas 48 horas de la sensibilización se provocó la reacción anafiláctica por administración intravenosa (i.v) de un mL de una disolución de OVA al 0,1 % en colorante azul de Evans 1 % en disolución salina fisiológica. Treinta minutos después, los animales se sacrificaron en atmósfera de éter y se recortó la zona dorsal de la piel. Posteriormente, se cortó en círculo la porción de la piel correspondiente a cada mancha y se colocó en un tubo de ensayo con dos mL de formamida. Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 horas y se determinó la densidad óptica del colorante extravasado en un espectrofotómetro (Pharmacia, LKB UltrospecPlus) a 620 nm [Katayama y cols., 1978]. La cantidad de colorante extravasado se consideró una medida indirecta de la cantidad de IgE presente en el antisuero evaluado. Se cuantificó la cantidad de colorante extravasado por extrapolación en una curva de calibración de azul de Evans (0,05-10 µg/mL).

2.4.5. Respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas

Para evaluar el efecto sobre la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE se conformaron seis grupos experimentales de ocho ratas Wistar, las cuales recibieron tratamiento con el extracto de *M. indica* (50, 100, 250 y 500 mg/kg), mangiferina (50 mg/kg) o cromoglicato sódico (3 mg/kg) según correspondía. Los animales recibieron tratamiento oral con el extracto de *M. indica* y mangiferina siguiendo una relación peso volumen de 10 mL/kg de peso en una administración diaria durante 21 días. Posteriormente se provocó una reacción anafiláctica mediante sensibilización con antisuero reagínico (suero con alto título de IgE, obtenido en el grupo control del punto 2.4.4.1, en una dilución 1/128). Se evaluaron en cada rata tres réplicas de la dilución 1/128 del antisuero reagínico. Transcurridas 48 horas de la

sensibilización se provocó la reacción anafiláctica por administración i.v de un mL de una disolución de OVA al 0,1 % en colorante azul de Evans 1 % en disolución salina fisiológica. El grupo que le correspondía tratamiento con cromoglicato disódico, lo recibió por vía i.v cinco minutos antes de la administración de la OVA con el colorante. Treinta minutos después de la administración i.v de la OVA y el colorante, los animales se sacrificaron en atmósfera de éter. Para la determinación del colorante extravasado se procedió como se describió en la sección 2.4.4.2.

2.5. Análisis estadístico

En todos los experimentos, los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (E.E.M) de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron por el método no paramétrico Kruskal-Wallis y cuando se obtuvieron diferencias intragrupalas, se utilizó la prueba de Dunn's a posteriori. Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico Statistic sobre Windows (Release 4.0, Statsoft, Inc. 1993). Valores probabilísticos (p) inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Para calcular la dosis efectiva media (DE₅₀) en los experimentos in vivo, definida como la dosis de cada fármaco necesaria para producir el 50 % del efecto máximo, se utilizaron análisis de regresión. De la misma manera se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) para los experimentos in vitro, definida como la concentración de cada fármaco necesaria para producir el 50 % del efecto máximo.

En los casos en que se calculó el % de Inhibición, se procedió de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - (\text{media valores de la muestra} / \text{media valores controles}) \times 100$$

3. RESULTADOS.

3.1. Efectos del extracto de M. indica y mangiferina sobre la funcionalidad de los macrófagos peritoneales

En todos los ensayos realizados in vitro se evaluaron condiciones experimentales con el vehículo utilizado (DMSO 0,4 % en DMEM) para disolver el extracto y la mangiferina, obteniéndose en cada caso un efecto similar al del grupo control (datos no mostrados), lo que demuestra que el DMSO a la concentración utilizada para la disolución de los productos no influye en los resultados que se obtuvieron en la evaluación de estos.

La evaluación de la viabilidad celular de macrófagos evidenció que concentraciones del extracto de M. indica y mangiferina inferiores a 800 µg/mL y 900 µg/mL respectivamente no resultaron citotóxicas para los macrófagos peritoneales de ratas, manteniéndose la viabilidad celular por encima del 95% (datos no mostrados), por lo que se consideró posible evaluar concentraciones inferiores a estas para los ensayos farmacológicos in vitro. El vehículo utilizado para la disolución de los productos tampoco afectó la viabilidad celular.

3.1.1. Efecto in vivo del extracto de M. indica y la mangiferina sobre la capacidad quimiotáctica de macrófagos peritoneales de ratas

La administración i.p de tioglicolato estimuló la migración de macrófagos hacia el peritoneo de las ratas, alcanzándose una acumulación de 21×10^6 células/mL (Figura 1A) donde más del 70% de esa población celular eran macrófagos (Figura 1B). Como resultado de la administración i.p de una única dosis del extracto de M. indica o de mangiferina (10, 50, 100, 150 mg/kg) se evidenció una significativa reducción ($p \leq 0,01$) del número total de células que migraron al peritoneo en respuesta al estímulo inflamatorio (Figura 1A). En ambos casos, el efecto fue dependiente de la dosis utilizada, con coeficientes de correlación dosis vs. porcentaje

de inhibición de $r^2=0,9901$ y $0,9981$, respectivamente. El efecto inhibitorio máximo para el extracto de *M. indica* fue de 88% y la DE_{50} de 22 mg/kg. En el caso de la mangiferina, se alcanzó un efecto inhibitorio máximo de la migración celular de 53 % y la DE_{50} fue de 15 mg/kg. La reducción del número de células peritoneales totales se correspondió con una reducción del número de macrófagos, pues la proporción de estos en la población celular total en cada caso se mantuvo constante (Figura 1B), o sea, que la reducción no fue a expensas de otro tipo de población celular peritoneal diferente a los macrófagos.

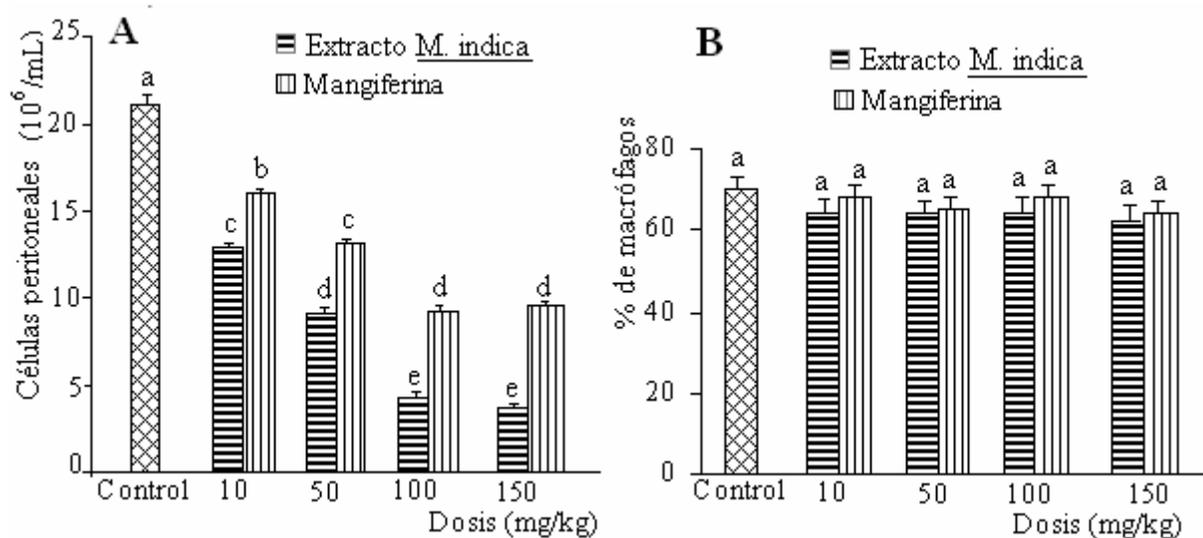


Figura 1. Efecto de una dosis única del extracto de *M. indica* y la mangiferina (i.p) en el recuento celular del exudado peritoneal de ratas cinco días después de la administración i.p de tioglicolato A) Número total de células del exudado peritoneal. B) Porcentaje de macrófagos en la población celular total. Los valores representan la media \pm E.E.M de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$) entre grupos.

3.1.2. Efecto in vitro del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de ratas

Las concentraciones evaluadas del extracto de *M. indica*, mangiferina y resveratrol redujeron significativamente ($p \leq 0,05$) la actividad fagocítica in vitro de macrófagos peritoneales de ratas (Figura 2). El efecto inhibitorio del extracto y mangiferina fue dependiente de la concentración

utilizada, con coeficientes de correlación $C(x)$ vs. porcentaje de inhibición de $r^2=0,9764$ y $0,9338$, respectivamente. La concentración inhibitoria media (CI_{50}) para el extracto de *M. indica* fue de $13,4 \mu\text{g/mL}$ y el efecto inhibitorio máximo fue del 53%, mientras que para la mangiferina la CI_{50} fue de $3 \mu\text{g/mL}$ y el efecto inhibitorio máximo fue del 59%. La inhibición ejercida por el extracto y la mangiferina a concentraciones de $10 \mu\text{g/mL}$ fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el del resveratrol a $25 \mu\text{g/mL}$, un polifenol que tiene acción inhibitoria *in vitro* sobre la fagocitosis [Leiro y cols., 2002]. Es interesante destacar que la inhibición de la mangiferina sobre la fagocitosis resultó superior a la del extracto pues alcanza un efecto inhibitorio máximo superior que el extracto con una CI_{50} menor.

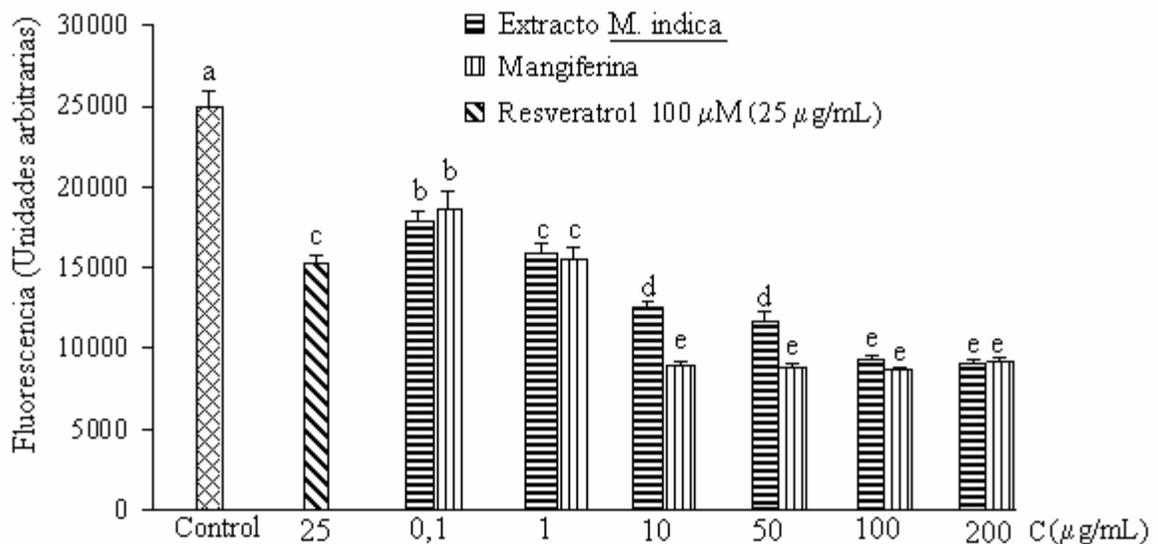


Figura 2. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica*, mangiferina y resveratrol en la fagocitosis de células *K. lactis* por macrófagos peritoneales de ratas. Los valores representan la media \pm E.E.M de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.1.3. Efecto in vitro del extracto de M. indica y la mangiferina sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratas

Los macrófagos peritoneales de ratas obtenidos como se describió en la sección 2.3., se estimularon in vitro con LPS e IFN γ durante 48 horas para inducir la producción de óxido nítrico. Como se muestra en la Figura 3, las concentraciones evaluadas del extracto de M. indica o mangiferina redujeron significativamente ($p \leq 0,05$) las concentraciones de nitritos en el sobrenadante celular, medida proporcional al efecto sobre la producción de óxido nítrico. El resveratrol, polifenol utilizado como referencia por su conocida inhibición sobre la producción de NO [Leiro y cols., 2002], también inhibió la producción de este mediador en estas condiciones experimentales. El efecto inhibitorio del extracto fue dependiente de la concentración utilizada, con coeficiente de correlación $C(x)$ vs. porcentaje de inhibición de $r^2=0,962$, con una CI_{50} de 9,9 $\mu\text{g/mL}$ y un efecto inhibitorio máximo de 63%. Para la mangiferina se alcanzó un efecto inhibitorio máximo de 46% pero no se alcanza un efecto dependiente de la concentración en el rango de concentraciones evaluadas que permita calcular la CI_{50} .

El L-NMMA utilizado como referencia inhibió significativamente ($p \leq 0,01$) la producción de NO, pues es un inhibidor de la NOS-2 [Ricciardolo y cols., 2001].

3.1.4. Efecto in vitro del extracto de M. indica sobre los niveles de ARNm de NOS-2 en macrófagos peritoneales murinos

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del extracto de M. indica (4, 40 y 400 $\mu\text{g/mL}$) y la dexametasona (40 $\mu\text{g/mL}$) en los niveles del ARNm de NOS-2 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS e IFN γ utilizando la técnica de RT-PCR. El extracto de M. indica redujo significativamente ($p \leq 0,01$) los niveles de ARNm de NOS-2

desde la menor concentración evaluada (4 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 4), con un efecto inhibitorio similar de 88, 91 y 93 % para las concentraciones de 4, 40 y 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Las cantidades de ARNm de NOS-2 detectadas en las células tratadas con las diferentes concentraciones del extracto fueron significativamente menores ($p \leq 0,01$) con respecto al obtenido para la dexametasona, fármaco que inhibe la expresión de ARNm de NOS-2 [Korhonen y cols., 2002] (Figura 4).

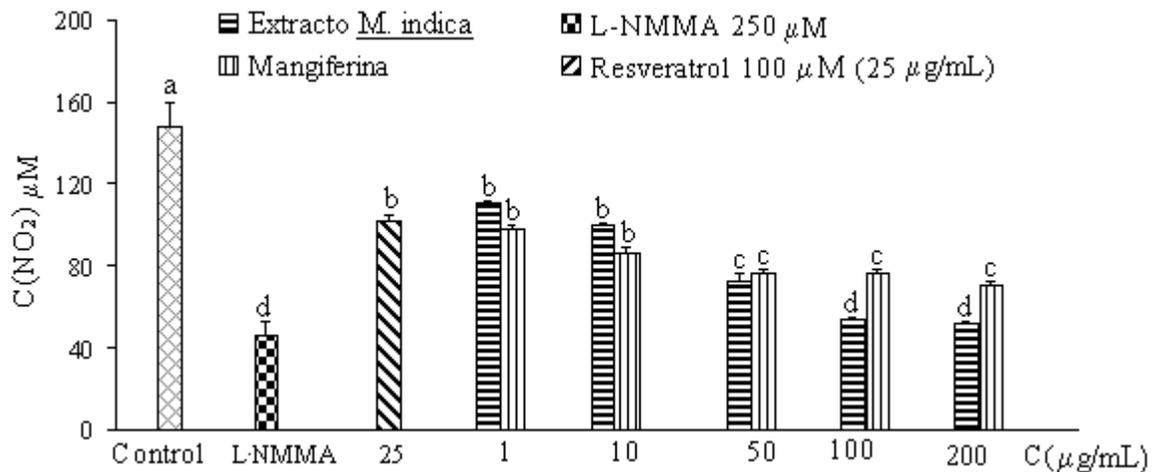


Figura 3. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica*, mangiferina, resveratrol y L-NMMA sobre las concentraciones de nitritos producidos en macrófagos peritoneales murinos estimulados durante 48 horas con LPS e $\text{IFN}\gamma$, determinado por la reacción de Griess. Los valores representan la media \pm E.E.M de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.1.5. Efecto *in vitro* del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la expresión de la enzima NOS-2 en macrófagos peritoneales murinos

Para comprobar el efecto del extracto de *M. indica* y la mangiferina en la expresión de la NOS-2 se determinó la cantidad de esta enzima en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos murinos después de seis horas de la estimulación.

El extracto de *M. indica* a concentraciones de 4, 40 y 400 $\mu\text{g/mL}$ redujo significativamente ($p \leq 0,05$) los niveles de expresión de la proteína NOS-2 (Figura 5). De igual forma, la

mangiferina a la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ inhibió la cantidad de proteína expresada en las células (Figura 5). Los resultados se corresponden con la inhibición de la producción de NO demostrada para el extracto y la mangiferina en la sección 3.1.3.

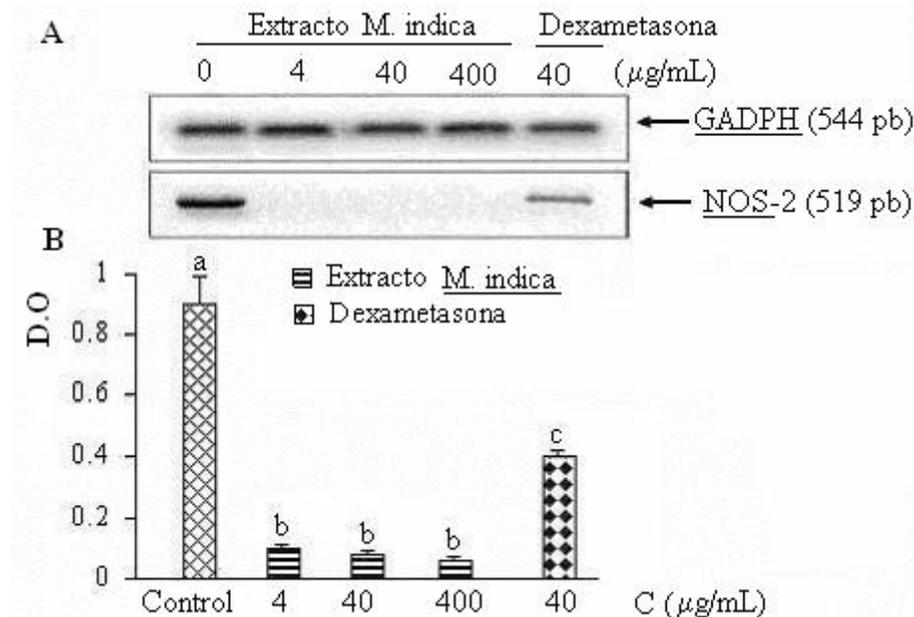


Figura 4. Efectos in vitro del extracto de *M. indica* y dexametasona en los niveles del ARNm de NOS-2 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS e $\text{IFN}\gamma$, determinado por RT-PCR. A) Análisis de los productos de RT-PCR en el gel de agarosa 2 %; B) Niveles de ARNm cuantificados por análisis densitométrico, en todos los casos expresados con respecto al valor obtenido para GADPH en el mismo gel. Las barras muestran la media \pm E.E.M de [DO banda NOS-2/DO banda GADPH], DO densidad óptica] de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$) entre grupos.

3.1.6. Efecto in vitro del extracto de *M. indica* sobre los niveles de ARNm de COX-1 y COX-2 en macrófagos peritoneales murinos

Los efectos del extracto de *M. indica* (4, 40 y 400 $\mu\text{g/mL}$) en la expresión del ARNm de las isoformas COX-1 y COX-2 se evaluaron por RT-PCR y se empleó como referencia el fármaco dexametasona a concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ (100 μM), un conocido inhibidor de la biosíntesis del ARNm de las COX [Fernández-Morata y cols., 2000]. El extracto de *M. indica* no redujo marcadamente los niveles de ARNm de COX-1, solo se alcanzó una reducción

estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) con la mayor concentración evaluada del extracto (400 $\mu\text{g/mL}$), así como con la dexametasona (40 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 6A, B). En contraste, tanto el extracto como la dexametasona redujeron significativamente ($p \leq 0,01$) los niveles del ARNm de COX-2 a todas las concentraciones evaluadas (Figura 6A, C).

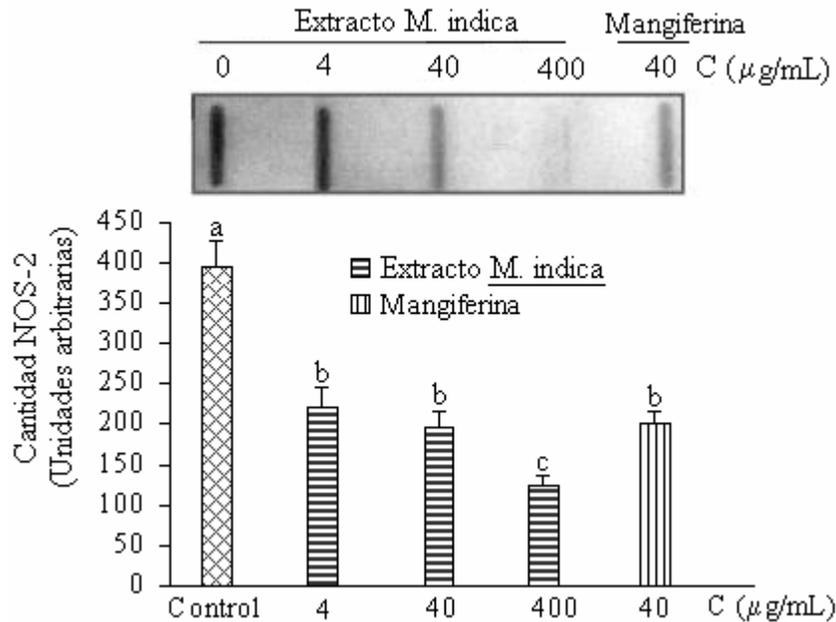


Figura 5. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica* y mangiferina en los niveles de proteína NOS-2 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS e $\text{IFN}\gamma$, determinado por *slot-blot*. Los resultados muestran un *blot* representativo (uno de tres experimentos) y la media \pm E.E.M de la cantidad de NOS-2 determinado por densitometría. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.1.7. Efecto *in vitro* del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la expresión de COX-2 en macrófagos peritoneales murinos

El extracto de *M. indica* a concentraciones de 4, 40 y 400 $\mu\text{g/mL}$ y mangiferina a 40 $\mu\text{g/mL}$ redujeron significativamente ($p \leq 0,05$) los niveles de proteína COX-2 (Figura 7), lo que hace corresponder en el caso del extracto la inhibición de la expresión del ARNm de la COX-2 con la reducción de la expresión de la proteína en el sistema celular utilizado. El extracto (400 $\mu\text{g/mL}$) y la mangiferina (40 $\mu\text{g/mL}$) tienen similar efecto inhibitorio sobre la expresión de la

enzima COX-2, lo que sugiere que la presencia de mangiferina en el extracto de *M. indica* está relacionada con el efecto inhibitorio de este sobre los niveles de COX-2.

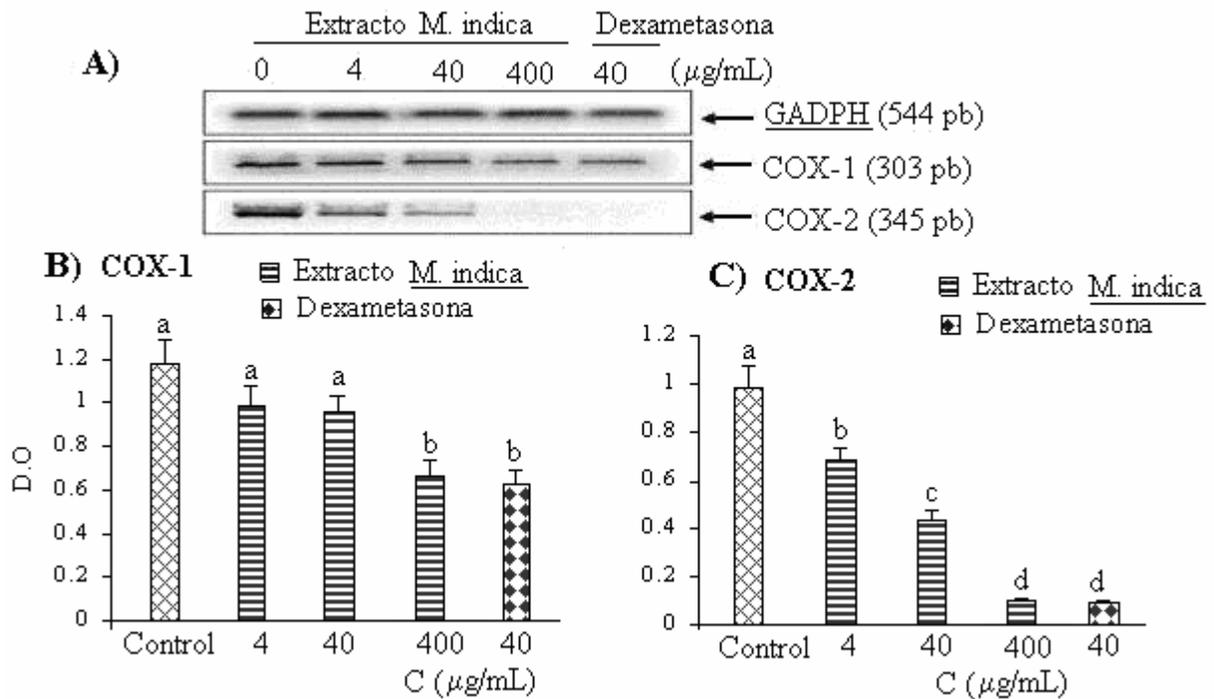


Figura 6. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica* y dexametasona en los niveles de ARNm de COX-1 y COX-2 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS e IFN γ , determinado por RT-PCR. A) análisis de los productos de RT-PCR en el gel de agarosa 2 %; B y C) Niveles de ARNm de COX-1 y COX-2 respectivamente, cuantificados por análisis densitométrico, en todos los casos expresados con respecto al valor obtenido para GADPH en el mismo gel. Las barras muestran la media \pm E.E.M. de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.1.8. Efecto *in vitro* del extracto de *M. indica* sobre los niveles de ARNm de **NF κ B** e **I κ B** en macrófagos peritoneales murinos

Los efectos del extracto de *M. indica* en la expresión de los genes que codifican para el complejo **NF κ B/I κ B** se evaluaron por RT-PCR y se demostró que el extracto reduce significativamente ($p \leq 0,05$) los niveles de ARNm de **NF κ B** a las concentraciones de 40 y 400 µg/mL (Figuras 8A, C), al igual que la dexametasona a concentración de 40 µg/mL. A las

concentraciones evaluadas, ni el extracto de *M. indica* ni la dexametasona redujeron significativamente ($p \geq 0,05$) los niveles de ARNm de $I\kappa B$ (Figura. 8A, B).

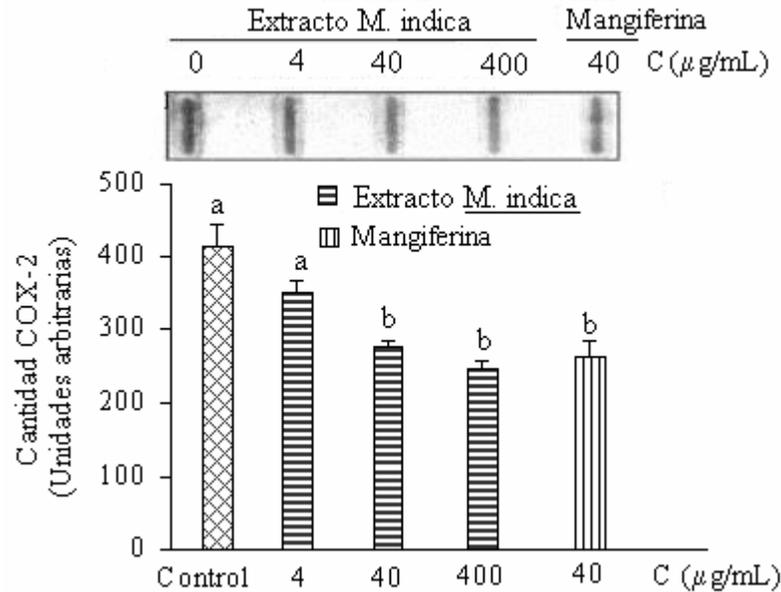


Figura 7. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica* y mangiferina en los niveles de proteína COX-2 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS e $IFN\gamma$, determinados por *slot-blot*. Los resultados muestran un blot representativo (uno de tres experimentos y la media \pm E.E.M de la cantidad de COX-2 determinado por densitometría. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.1.9. Efecto del extracto de *M. indica* sobre los niveles del ARNm de citocinas relacionadas con el proceso inflamatorio en macrófagos peritoneales murinos

La reacción de reverso-transcripción con reacción múltiple de la polimerasa en cadena (*RT-MPCR*) es un método muy sensible y exacto para medir los niveles de expresión de múltiples genes [Dostal y cols., 1998]. Mediante esta técnica, se evaluaron los efectos del extracto de *M. indica* en la transcripción del ARNm de varias citocinas producidas por los macrófagos: $IL-1\beta$, $IL-6$, $GM-CSE$, $TGF\beta$ y $TNF\alpha$. En este ensayo se utilizó la dexametasona como fármaco de referencia, la cual presenta un conocido efecto inhibitorio sobre la transcripción del ARNm de estas citocinas [Levine y cols., 1993].

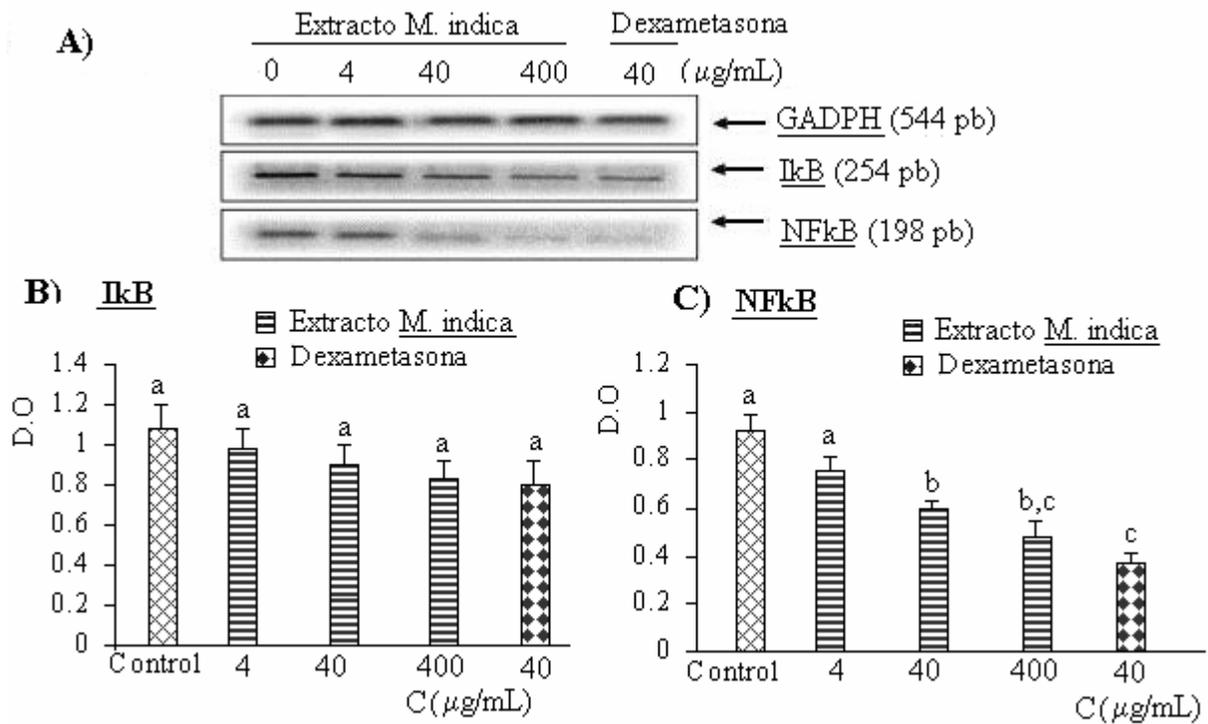


Figura 8. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica* y dexametasona en los niveles de ARNm de IκB y NFκB en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS e IFN γ , determinado por RT-PCR. A) análisis de los productos de RT-PCR en el gel de agarosa 2 %; B y C) Niveles de ARNm de IκB y NFκB respectivamente, cuantificados por análisis densitométrico, en todos los casos expresados con respecto al valor obtenido para GADPH en el mismo gel. Las barras muestran la media \pm E.E.M de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

El extracto de *M. indica* a concentraciones de 40 y 400 $\mu\text{g/mL}$ redujo significativamente ($p \leq 0,05$) los niveles de ARNm de TNF α , IL-1 β y el GM-CSF, sin afectar los niveles de ARNm de IL-6 e incrementando significativamente ($p \leq 0,05$) los de TGF β (Figura 9B). A concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$, la dexametasona disminuyó significativamente los niveles de ARNm de todas las citocinas evaluadas excepto el TGF β (Figura 9).

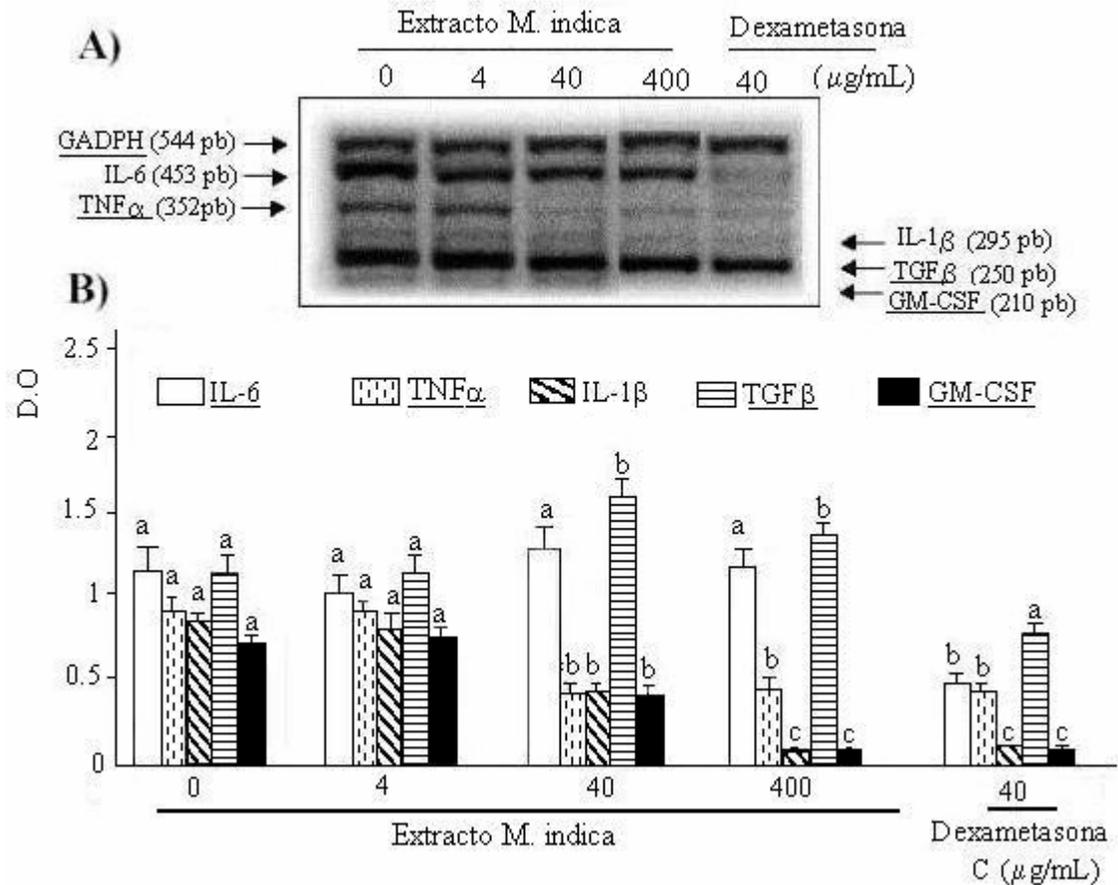


Figura 9. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica* y dexametasona en los niveles de ARNm de IL-6, TNF α , IL-1 β , TGF β y GM-CSF en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS e IFN γ , determinado por RT-PCR. A) Análisis de los productos de RT-MPCR corridos en un gel de agarosa 2 %; B) niveles de ARNm cuantificados por análisis densitométrico, en todos los casos expresados con respecto al valor obtenido para GADPH en el mismo gel. Las barras muestran la media \pm E.E.M. de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos para una misma citocina.

3.1.10. Efecto del extracto de *M. indica* sobre la expresión de TNF α en macrófagos peritoneales murinos

Se evaluó además mediante un ensayo inmunoenzimático el efecto del extracto en las concentraciones de TNF α y se demostró que a 40 y 400 $\mu\text{g/mL}$ redujo significativamente ($p \leq 0,05$) la concentración de TNF α . El efecto del extracto fue dependiente de la concentración, con coeficiente de correlación $C(x)$ vs porcentaje de inhibición de 0,97 y una CI_{50} de 85,73 $\mu\text{g/mL}$. La dexametasona también redujo significativamente ($p \leq 0,01$) la

cantidad de esta citocina en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos peritoneales murinos, con efecto dependiente de la concentración, coeficiente de correlación $C(x)$ vs porcentaje de inhibición de 0,96 y una CI_{50} de 45,06 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10).

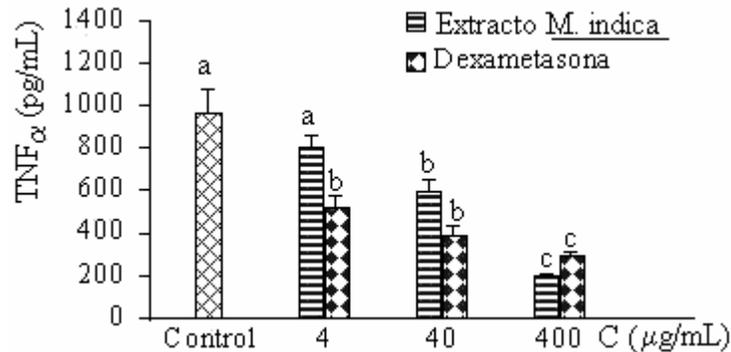


Figura 10. Efectos *in vitro* del extracto de *M. indica* y dexametasona en las concentraciones de $TNF\alpha$ en sobrenadante de cultivo de macrófagos murinos estimulados con LPS e $IFN\gamma$, determinado por ELISA captura. Los resultados representan la media \pm E.E.M. de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.2. Efectos del extracto acuoso de *M. indica* y la mangiferina sobre la respuesta alérgica

3.2.1. Efecto *in vivo* del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre el edema plantar inducido por OVA y la proliferación linfocitaria específica al antígeno en ratones inmunizados

El edema plantar inducido por OVA en animales previamente inmunizados con el mismo antígeno desarrolla una reacción alérgica inflamatoria que constituye un adecuado modelo *in vivo* para evaluar las propiedades antialérgicas de un producto [Kim y cols., 2003].

Los ratones sensibilizados i.p de forma repetida con OVA y tratados durante siete días por vía oral con el extracto de *M. indica* e indometacina evidenciaron una significativa reducción ($p \leq 0,05$) del edema plantar inducido por OVA comparado con el grupo control (Tabla 4). El efecto del extracto fue dependiente de la dosis, con coeficientes de correlación Dosis vs. porcentaje de inhibición de $r^2=0,9703$ y una DE_{50} de 54,5 mg/kg. La máxima inhibición

obtenida con el extracto fue de 58 % con la dosis de 250 mg/kg (Tabla 7). El tratamiento con mangiferina a la dosis de 50 mg/kg no redujo significativamente ($p \geq 0,05$) el edema plantar inducido por OVA.

Por otra parte, la respuesta proliferativa específica a la estimulación *in vitro* con OVA de los esplenocitos de los ratones inmunizados con este mismo antígeno fue inhibida significativamente ($p \leq 0,05$) por el tratamiento con 100, 250 y 500 mg/kg del extracto de *M. indica* y con 50 mg/kg de mangiferina (Figura 11), alcanzándose niveles similares a la de los animales no inmunizados.

Tabla 4. Efecto del pretratamiento durante siete días v.o con el extracto de *M. indica*, mangiferina e indometacina en el edema plantar inducido por OVA en ratones inmunizados.

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Índice de edema (g)	% inhibición de la inflamación alérgica.
No inmunizados	-	$19 \pm 0,7^a$	-
Control	-	$52 \pm 4,8^b$	-
Extracto de <i>M. indica</i>	50	$38,9 \pm 0,7^c$	26
	100	$32,4 \pm 1,5^d$	39
	250	$22,9 \pm 3,8^e$	58
	500	$23,2 \pm 2^e$	59
Mangiferina	50	$43,8 \pm 4,6^b$	16
Indometacina	5	$23,2 \pm 3,5^e$	57

Los resultados expresan el índice de edema (g) y el % de inhibición de la inflamación alérgica. Los resultados constituyen la media \pm E.E.M de tres experimentos. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

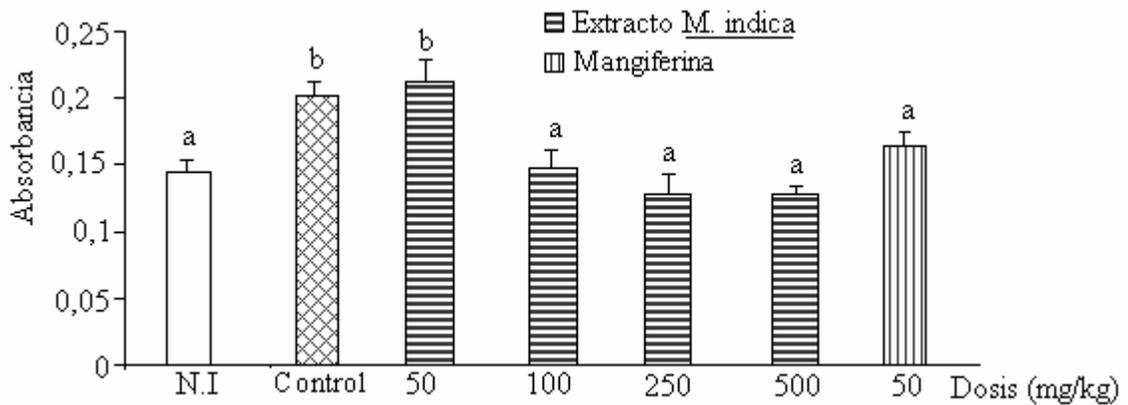


Figura 11. Efecto del extracto de *M. indica* y la mangiferina en la proliferación linfocitaria en respuesta a OVA en ratones inmunizados, determinado por el ensayo de MTT. Los resultados constituyen la media \pm E.E.M de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos. (NI: Grupo no inmunizado)

3.2.2. Efecto in vivo del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre el incremento de permeabilidad capilar inducido por histamina en ratas

En el presente estudio se evaluó el efecto del pretratamiento durante siete días con el extracto de *M. indica* y mangiferina en el incremento de permeabilidad capilar inducido por histamina durante una reacción cutánea en ratas. Se utilizó como control positivo la prometazina, un conocido inhibidor de los receptores histaminérgicos tipo uno.

El tratamiento con el extracto de *M. indica*, mangiferina y prometazina inhibieron significativamente ($p \leq 0,05$) la reacción cutánea inducida por la histamina como resultado del incremento de permeabilidad capilar inducido por esta biomolécula, que provoca la extravasación del colorante azul de Evans administrado i.v (Tabla 5). El extracto evidenció un efecto dependiente de la dosis, con un coeficiente de correlación dosis vs % de inhibición de $r^2 = 0,9$, una DE_{50} de 54,3 mg/kg y un efecto inhibitorio máximo de 73% a la dosis de 250 mg/kg.

Tabla 5. Efecto del pretratamiento durante siete días v.o con el extracto de *M. indica*, mangiferina y prometazina en la reacción cutánea inducida por histamina en ratas.

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Azul de Evans extravasado ($\mu\text{g}/\text{sitio}$)	% inhibición de la reacción cutánea.
Control	-	$23,12 \pm 1,11^a$	-
Extracto de <i>M. indica</i>	50	$16,15 \pm 1,3^b$	30,1
	100	$10,79 \pm 1,1^c$	53,3
	250	$6,21 \pm 1,4^d$	73,1
	500	$6,23 \pm 1,9^d$	73
Mangiferina	50	$8,49 \pm 2,31^{c,d}$	63,2
Prometazina.	25	$0,81 \pm 0,19^e$	96,5

Los resultados expresan los μg de azul de Evans extravasado/sitio, medida proporcional al incremento de la permeabilidad capilar inducido por la histamina y constituyen la media \pm E.E.M de tres experimentos. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.2.3. Efecto in vitro del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la liberación de histamina de mastocitos peritoneales de ratas

Las concentraciones de extracto y mangiferina utilizadas en este ensayo no afectaron la viabilidad de los mastocitos, la cual se mantuvo por encima del 97%.

La liberación de histamina de los mastocitos se evaluó por inducción de la desgranulación mastocitaria mediante la utilización del compuesto 48/80. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, la liberación espontánea de histamina fue del 3,1% y la máxima desgranulación inducida por el compuesto 48/80 fue del 52,7%. El extracto de *M. indica* y la mangiferina tuvieron efecto inhibitorio significativo ($p \leq 0,01$) en la liberación de histamina de los mastocitos (Figura 12). En ambos casos, el efecto es dependiente de la concentración, con coeficientes de correlación $C(x)$ vs. porcentaje de inhibición de $r^2=0,9774$ y $0,9717$ para el extracto y la mangiferina, respectivamente. La CI_{50} del extracto fue de $51,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $52,4 \mu\text{g}/\text{mL}$ para la mangiferina y en ambos casos se alcanzó un efecto inhibitorio máximo del 93%

con la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$. El cromoglicato disódico utilizado como fármaco de referencia también inhibió significativamente la liberación de histamina.

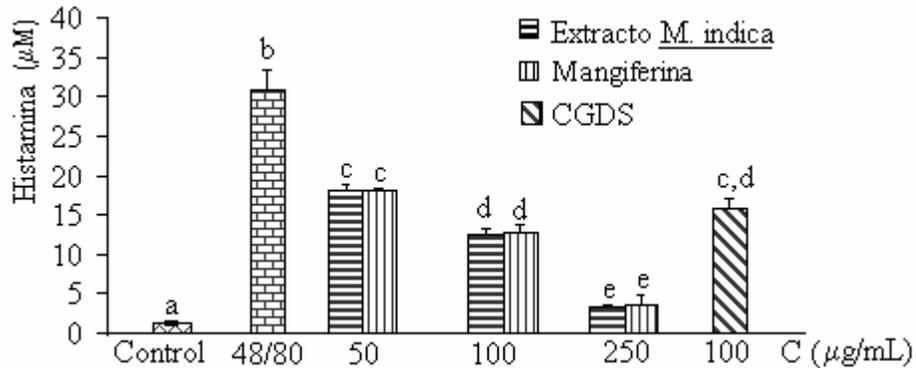


Figura 12. Efecto del extracto de *M. indica*, mangiferina y cromoglicato disódico (CGDS) en la liberación de histamina inducida por el compuesto 48/80 en mastocitos, determinado por un método fluorescente. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$) entre grupos.

3.2.4 Efecto del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la producción de IgE en ratones

Para la evaluación del efecto del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la producción de IgE en respuesta a la inmunización con OVA, se determinaron los niveles de esta Ig mediante la técnica de anafilaxia pasiva cutánea (APC) en ratas. La sensibilización i.d de las ratas con diferentes diluciones de los sueros de los ratones inmunizados con OVA y tratados con las diferentes dosis de las sustancias objeto de ensayo, con el posterior desencadenamiento de la reacción anafiláctica por administración endovenosa de OVA en las ratas, permitió estimar los niveles de IgE en el suero de los ratones como medida proporcional a la cantidad de Azul de Evans extravasado. Se evaluaron cuatro diluciones seriadas de los sueros de los ratones (1/64, 1/128, 1/256 y 1/512) y se obtuvo en cada caso una disminución de la extravasación del colorante proporcional al incremento de la dilución (Datos no mostrados, solo se muestra en la tabla 6 el resultado para la dilución de 1/256).

El tratamiento durante 21 días con el extracto de *M. indica* en dosis de 100, 250 y 500 mg/kg, mangiferina 50 mg/kg y ketotifeno 3 mg/kg en ratones inmunizados con OVA, evidenció una reducción significativa ($p \leq 0,05$) de los niveles de IgE anti-OVA producidos en respuesta a la inmunización (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del tratamiento v.o durante 21 días con extracto de *M. indica*, mangiferina y ketotifeno en los niveles de IgE en el suero de ratones inmunizados con OVA, determinado por anafilaxia pasiva cutánea.

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Azul de Evans extravasado ($\mu\text{g/sitio}$) Dilución del suero 1/256	% de inhibición de la extravasación del colorante
Control	-	$6,2 \pm 0,02^a$	-
Extracto de <i>M. indica</i>	50	$6,9 \pm 0,08^a$	-
	100	$3,5 \pm 0,05^b$	46,8
	250	$3,2 \pm 0,18^b$	51,6
	500	$3,1 \pm 0,15^b$	53,1
	Mangiferina	50	$3,6 \pm 0,06^b$
Ketotifeno	3	$2,3 \pm 0,25^b$	60,8

Los resultados expresan los μg de azul de Evans extravasado/sitio, medida proporcional a los niveles de IgE en el suero y constituyen la media \pm E.E.M de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

3.2.5. Efecto del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas

El efecto del pretratamiento en ratas durante 21 días con el extracto de *M. indica* y la mangiferina en el desencadenamiento de la respuesta anafiláctica cutánea mediada por IgE se evaluó a través de la sensibilización i.d en ratas con suero reagínico rico en IgE anti-OVA y la posterior administración de la OVA endovenosa como alérgeno desencadenante de la anafilaxia. El tratamiento oral en ratas con las dosis de 100, 250 y 500 mg/kg del extracto de *M. indica*, así como mangiferina en dosis de 50 mg/kg, inhibieron significativamente ($p \leq 0,05$) el desencadenamiento de la reacción anafiláctica en respuesta a la OVA (Tabla 7). La

administración endovenosa de 3 mg/kg de cromoglicato disódico cinco minutos antes de la exposición al antígeno, también mostró una inhibición significativa de la reacción anafiláctica.

Tabla 7. Efecto del tratamiento v.o durante 21 días con el extracto de *M. indica*, mangiferina y cromoglicato disódico (dosis única i.v) en la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Azul de Evans extravasado (µg/sitio) Dilución del suero 1/128	% de inhibición de la extravasación del colorante
Control	-	12,7 ± 1,5 ^a	
Extracto de <i>M. indica</i>	50	8,2 ± 0,5 ^{a,c}	35,1
	100	6,6 ± 0,6 ^b	47,9
	250	5,9 ± 0,6 ^b	53,3
	500	5,8 ± 0,5 ^b	54,3
Mangiferina	50	7,6 ± 0,8 ^{b,c}	35,1
Cromoglicato disódico	3	5,6 ± 1,4 ^b	55,4

Los resultados expresan los µg de azul de Evans extravasado/sitio, lo que es proporcional a la magnitud de la respuesta anafiláctica desencadenada. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

4. DISCUSION

El presente trabajo abordó la evaluación del efecto inmunomodulador del extracto de M. indica en dos aspectos fundamentales de la respuesta inmune: las funciones de los macrófagos y la respuesta alérgica.

Las propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias de este extracto natural y de la mangiferina [Martínez y cols, 2000; 2001a; Garrido y cols., 2001; 2004a,b; 2005; 2006] constituyeron los principales antecedentes para esta investigación, basado en la estrecha relación entre la respuesta inmune, el estrés oxidativo y la inflamación [Matés y cols., 1999; 2000].

4.1. El extracto de M. indica y la mangiferina modulan importantes funciones de los macrófagos

Los macrófagos son una población celular de vital importancia para la respuesta inmune porque participan en importantes procesos como la fagocitosis de partículas, la presentación de antígenos, la producción de citocinas, ERO y ERN con el objetivo de controlar determinada agresión al organismo. La sobre-estimulación de estas células o los fallos en sus mecanismos de regulación puede inducir un estado inflamatorio crónico que conduce al fallo tisular e incluso a la necrosis.

En el presente trabajo se evaluaron los efectos del extracto acuoso de M. indica y la mangiferina sobre diferentes e importantes funciones de los macrófagos de roedores como la quimiotaxis, la fagocitosis, la producción de NO, la expresión de las enzimas NOS-2, COX-1 y COX-2, de citocinas involucradas en la respuesta inmune, del factor NFκB y su inhibidor IκB.

La quimiotaxis y la acumulación de macrófagos y otros tipos celulares en los tejidos es uno de los pasos iniciales en la respuesta inmune y es un proceso controlado por moléculas de

adhesión, quimiocinas y citocinas [Khan y cols., 2003]. En este trabajo se demostró que el extracto de *M. indica* y la mangiferina, en dosis i.p únicas entre 10 y 150 mg/kg, inhiben la acumulación de macrófagos en el peritoneo de las ratas en respuesta a un estímulo inflamatorio. El efecto inhibitorio del extracto sobre la quimiotaxis de los macrófagos es superior al de la mangiferina, lo que evidencia que la presencia de este polifenol contribuye al efecto del extracto, pero que otros componentes pueden tener acción sinérgica. Previamente se publicó un efecto inhibitorio *in vitro* del 80% en la quimiotaxis de neutrófilos a concentración de 200 µg/mL del extracto de *M. indica* [Delgado y cols., 2001]. Otros estudios evidenciaron sus propiedades inhibitorias *in vitro* y las de mangiferina (50 y 100 µg/mL) sobre la expresión de *ICAM-1* en células endoteliales HUVEC estimuladas con IL-1β [Beltrán y cols., 2003]. Probablemente esta última evidencia contribuya a la reducción de la migración de los macrófagos demostrada para el extracto. La inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos así como de la expresión de *ICAM-1* conducen a una reducción de la acumulación celular en los tejidos que puede ser beneficiosa en el tratamiento de desórdenes inflamatorios e inmunopatológicos [Beltrán y cols., 2003].

Existen reportes científicos que acreditan efectos similares a los de *M. indica* obtenidos con otros productos naturales. Varias lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Sausurea lappa* C. presentan actividad inhibitoria *in vitro* sobre la expresión de *ICAM-1* y los autores plantean que pueden ser útiles en el tratamiento de determinadas patologías en las que la expresión excesiva de *ICAM-1* en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos desempeña un papel fundamental [Yuuya y cols., 1999]. De la misma manera, una fracción de esteroides obtenidas del extracto de *Sideritis foetens* C. inhibe la infiltración de neutrófilos y macrófagos en los tejidos inflamados [Navarro y cols., 2001].

La fagocitosis es un proceso importante en los mecanismos de defensa de los organismos multicelulares. Uno de los principales objetivos de la fagocitosis, además de la propia destrucción del agente patógeno, es la presentación de los péptidos antigénicos a las células T para activar respuestas inmunes adaptativas capaces de controlar el proceso infeccioso. En algunos tipos de respuestas inmunes como la de hipersensibilidad retardada, este proceso de presentación antigénica constituye un mecanismo de amplificación mediante el cual se activan cada vez más células Th1 por el reconocimiento de los péptidos antigénicos presentados en el contexto MHC II de los macrófagos. Las células Th1 secretan $IFN\gamma$ y otras citocinas que a su vez activan más macrófagos, lo que conduce a una acumulación y activación celular que puede terminar con el daño tisular [Laskin y Pendido, 1995]. En el presente trabajo se demostró que el extracto de M. indica y la mangiferina inhiben in vitro la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de ratas frente a partículas de levaduras. El efecto del extracto y de la mangiferina a 10 $\mu\text{g/mL}$ fue significativamente superior al obtenido para el resveratrol a 25 $\mu\text{g/mL}$, polifenol que tiene acción inhibitoria sobre la actividad fagocítica de macrófagos [Leiro y cols., 2002]. Por otra parte, la mangiferina tiene un efecto inhibitorio sobre la fagocitosis superior al del extracto, con una CI_{50} menor y una saturación del efecto por encima de los 10 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados sugieren que al efecto inhibitorio del extracto contribuye notablemente la presencia de mangiferina, pero que otros componentes del mismo pudieran tener un efecto antagónico que conduzca a que el efecto del extracto sea inferior al de la mangiferina, pero no aparecen reportes en la literatura acerca de la acción de otros componentes del extracto sobre la fagocitosis. Aunque la acción del extracto y la mangiferina en el proceso de presentación de antígenos no se determinó, la inhibición de la fagocitosis puede conducir a una inhibición en este proceso, pues es el primer paso para el procesamiento

y presentación de antígenos, lo que podría sugerir que el extracto de *M. indica* y la mangiferina inhiban además de la fagocitosis, la presentación de antígenos en el contexto MHC II. La literatura refiere que algunos polifenoles como la quercetina y la rutina inhiben la presentación de antígenos por las CPA a los linfocitos T sin afectar la expresión de MHC II ni las moléculas coestimuladoras B7.1, B7.2 y CD40; y correlacionan este efecto inhibitorio sobre la presentación de antígenos con el efecto antioxidante de estos polifenoles [Gong y Chen, 2003].

El NO es un importante mediador en las respuestas inmunes pues está implicado en funciones biológicas como el control de la presión sanguínea, la agregación plaquetaria, la defensa frente a microorganismos infecciosos, entre otras [Martin y cols., 2000]. Cuando se produce en exceso por activación de la enzima NOS-2, puede inducir importantes daños celulares que se relacionan con la aparición de enfermedades como la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, el choque séptico, la aterosclerosis, entre otras [Takeda y cols., 2001; Kim y cols., 2001; Reiner y Tedeschi, 2001]. En esta investigación se demostró que el extracto de *M. indica* y la mangiferina (1-100 y 1-50 µg/mL, respectivamente) inhiben in vitro la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS e IFN γ . El efecto del extracto fue superior al de la mangiferina, lo que sugiere que además de ella otros de los componentes del extracto pueden contribuir a este efecto inhibitorio. El efecto del extracto fue similar al del resveratrol, polifenol que tiene acción inhibitoria sobre la producción de NO y que reduce la cantidad de proteína NOS-2 citosólica por un mecanismo post-transcripcional [Tsai y cols., 1999].

Para profundizar en el mecanismo de acción del extracto de *M. indica* que permita explicar la inhibición de la producción de NO, se diseñó una RT-PCR para determinar los niveles de ARNm de la NOS-2 en sobrenadante de cultivo de macrófagos peritoneales estimulados con

LPS e IFN γ . Los resultados demuestran que el extracto de *M. indica*, desde la concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$, inhibe significativamente *in vitro* el proceso de transcripción de los genes que codifican para la enzima NOS-2 y que no hay un efecto concentración dependiente en el rango entre 4-400 $\mu\text{g/mL}$, lo que podría explicarse por la fuerte inhibición ejercida a la menor concentración evaluada que satura el efecto e impide que este se incremente con el aumento de la concentración. Por otra parte, cuando se compara el efecto inhibitorio del extracto con el de dexametasona, fármaco utilizado como referencia, se observa que a igual concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$, la inhibición ejercida por el extracto sobre los niveles de ARNm de la enzima NOS-2 es superior al de la dexametasona.

En el año 2003, Leiro y cols. publicaron que la mangiferina, en el rango de concentración entre 1-100 $\mu\text{g/mL}$, reduce los niveles del ARNm de NOS-2 y que el efecto a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ es similar al obtenido con la misma concentración de dexametasona. Esto permite suponer que la inhibición en el proceso de transcripción de los genes de la NOS-2 demostrada para el extracto de *M. indica*, es al menos en parte, atribuible a la presencia de mangiferina. En tal sentido, se logró demostrar que tanto la mangiferina como el extracto inhiben *in vitro* las cantidades de proteína NOS-2 presentes en el sobrenadante de cultivo celular. En el caso de la inhibición de la expresión de la NOS-2, a diferencia de la inhibición sobre ARNm, el efecto del extracto sí es dependiente de la concentración, lo que sugiere que podrían existir otros eventos moduladores aún desconocidos en el complejo fenómeno entre la transcripción de ARNm y la biosíntesis de la proteína. Sin embargo, todas estas evidencias permite afirmar que el extracto de *M. indica* y la mangiferina reducen la producción de NO porque inhiben el proceso de transcripción genética y la expresión de la enzima NOS-2 en los macrófagos activados; y que la presencia de mangiferina en el extracto está involucrada en

este efecto, aunque otros componentes como la epicatequina que tiene acción inhibitoria sobre la NOS-2 también puedan contribuir [Ahmed y cols., 2002]. Estos resultados complementan la información existente sobre los efectos anti-inflamatorios y antioxidantes del extracto de M. indica y concuerdan con la inhibición demostrada para el extracto (100-500 µg/mL) sobre la expresión de la NOS-2 en células endoteliales [Beltrán y cols., 2004].

La literatura reconoce varios extractos naturales y componentes de origen natural que son capaces de interferir de diversas formas con la vía metabólica del NO. El extracto metanólico de Cyperus rotundus (5-100 µg/mL) inhibe producción de NO y la expresión de la NOS-2 [Seo y cols., 2001], efecto similar al del extracto de M. indica y en el mismo rango de concentraciones. La lactona sesquiterpénica ergolide inhibe la expresión de la NOS-2 a concentraciones de 10 µM [Whan y cols., 2001]. Estos compuestos de origen natural, al igual que el extracto de M. indica, pudieran ser útiles en el tratamiento de las enfermedades en las cuales se ha demostrado que el incremento de los niveles de NO está relacionado con su fisiopatología, como la diabetes, la artritis reumatoide, el choque séptico, la aterosclerosis, entre otras [Takeda y cols., 2001; Kim y cols., 2001; Reiner y Tedeschi, 2001].

Como parte de la caracterización de las acciones del extracto de M. indica sobre las funciones de los macrófagos, se estudiaron además los efectos en la expresión de las enzimas COX-2 y COX-1, responsables de la biosíntesis de PG. El extracto de M. indica mostró una inhibición más selectiva sobre la isoforma COX-2, pues inhibe los niveles de ARNm de COX-2 a concentraciones entre 4 y 400 µg/mL mientras que el ARNm de COX-1 se inhibió solo a la concentración de 400 µg/mL del extracto. Estos resultados concuerdan con los de un estudio realizado en ratas normotensas (SKY) e hipertensas (SHR), en el que se demostró la selectividad in vitro del extracto de M. indica sobre la COX-2, pues a 500 µg/mL no inhibió

la expresión de la enzima COX-1 en células endoteliales de ambas líneas de ratas, mientras a que concentraciones entre 100 y 500 $\mu\text{g/mL}$ sí inhibió la expresión de la COX-2 [Beltrán y cols., 2004].

Para comprobar que la inhibición de la transcripción del ARNm de la COX-2 se corresponde con una reducción en las concentraciones de la enzima y que además, la presencia de mangiferina en el extracto está involucrada en sus efectos, se demostró que tanto el extracto como la mangiferina redujeron significativamente los niveles de expresión de la proteína COX-2. Todos estos resultados explican por qué el extracto y la mangiferina reducen in vitro la producción de PGE2 en macrófagos activados [Garrido y cols., 2004b], pues inhiben la expresión de la enzima que participa en la biosíntesis de este importante mediador proinflamatorio.

Varios polifenoles incluida la epicatequina presente en el extracto, son capaces de inhibir la expresión de COX-2 y la producción de PGE2 en diversos tipos de células [Shimizu y cols., 2005; Hong y cols., 2001]. Otros de los componentes presentes en el extracto como los ácidos linoleico, mirístico, palmítico, esteárico y gálico presentan actividades inhibitoras sobre la COX-1 y la COX-2 [Calixto y cols., 2003; Madlener y cols., 2006]. Esto sugiere que, además de la mangiferina, otros componentes pueden contribuir al efecto inhibitorio del extracto sobre la expresión de la COX-2.

No abundan en la literatura reportes acerca de la selectividad de productos naturales en cuanto a la inhibición de la COX, aunque sí existen varios con capacidad inhibitoria sobre la actividad o la expresión de la COX-2. Por ejemplo, ergolide es una lactona sesquiterpénica que a 10 μM inhibe la expresión de la COX-2 [Whan y cols., 2001], mientras que el ácido linoleico presente en el extracto de *Angelica pubescens* inhibe la actividad de la COX-1 con una CI_{50} de 13,3

μM [Liu y cols., 1998]. Existe una investigación con coumarinas presentes en *Cachrys trifida* que sí estudia la selectividad sobre las COX y refiere que imperatorin a $100 \mu\text{M}$ tuvo similar inhibición sobre ambas isoformas de COX, mientras que isoimperatorin a esa misma concentración resultó más selectivo sobre la COX-2 [Abad y cols., 2001].

La relativa selectividad *in vitro* del extracto de *M. indica* sobre la isoforma COX-2 con respecto a la COX-1, de ser comprobada *in vivo*, podría favorecer su utilización en el tratamiento de la inflamación y contribuir a la reducción de los daños gastrointestinales asociados a la inhibición de la COX-1, pero debe prestarse especial atención en el caso de pacientes con riesgo cardiovascular. Los fármacos inhibidores selectivos de la COX-2 revolucionaron hace más de una década el tratamiento anti-inflamatorio y la hipótesis de su seguridad se basó en la premisa de que la isoforma COX-1 predomina en el estómago y produce PG protectoras de la mucosa gástrica, mientras que la COX-2 se induce durante los procesos inflamatorios [Mukherjee y Topol, 2003]. Sin embargo, los inhibidores selectivos de la COX-2 disminuyen la producción de prostaciclina vascular (PGI₂), la cual es un vasodilatador biológico y un inhibidor de la agregación plaquetaria. De esta forma estos fármacos, aunque no tienen efectos directos sobre el tromboxano A₂ (TXA₂), afectan el balance homeostático PGI₂/TXA₂ a favor de este último y favorecen eventos trombóticos cardiovasculares [Belton y cols., 2000]. Esto ha limitado la utilización de los inhibidores selectivos de la COX-2 en pacientes con riesgo cardiovascular [Mukherjee y Topol, 2003].

Numerosos reportes enfocan la interacción entre las vías del NO y las PG en los procesos inflamatorios. Se ha demostrado que el NO es necesario para el mantenimiento prolongado de la expresión de los genes de la COX-2 [Perkins y cols., 1999], así como para su actividad enzimática, por tanto, la inhibición que ejerce el extracto en la producción de NO, como

consecuencia de la inhibición de la transcripción de los genes de la NOS-2, puede contribuir además a la reducción de la expresión de la COX-2.

Las citocinas son mediadores proteicos involucrados en la mayoría de los procesos biológicos incluido el crecimiento, la activación y diferenciación celular, la inflamación y la inmunidad [Kulmatycki y Jamali, 2001]. Cualquier intento por caracterizar las propiedades inmunomoduladoras de un producto natural tiene necesariamente que estudiar sus efectos sobre la producción de citocinas. En esta investigación se determinaron los efectos in vitro del extracto de M. indica sobre la transcripción de los genes que codifican para la IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF β y GM-CSF, pues son importantes citocinas producidas por los macrófagos. Los resultados indicaron que el extracto de M. indica (40 y 400 $\mu\text{g/mL}$) redujo significativamente in vitro los niveles de ARNm de TNF α , IL-1 β y el GM-CSF, no afectó los niveles de ARNm de IL-6 e incrementó significativamente los de TGF β . La dexametasona (40 $\mu\text{g/mL}$) usada como referencia disminuyó los niveles de ARNm de todas las citocinas evaluadas excepto el TGF- β . Igualmente se determinó que el extracto y la dexametasona disminuyeron in vitro la cantidad de TNF α producida por los macrófagos, lo que hace corresponder la inhibición del ARNm con la inhibición de la síntesis proteica.

La literatura refiere que la mangiferina, el principal polifenol del extracto, inhibe in vitro la expresión de los genes que codifican para TNF α y favorece la expresión de TGF β en el rango de concentración entre 1-100 μM , por lo que el efecto del extracto sobre estas dos citocinas puede ser parcialmente atribuible a la presencia de mangiferina [Leiro y cols., 2003].

Estos resultados coinciden con estudios previos en los que se demostró la capacidad del extracto de M. indica de inhibir la producción de TNF α en líneas celulares de macrófagos

[Garrido y cols., 2004a]. Igualmente, estos autores demostraron que el extracto de *M. indica* reduce los niveles séricos de $\text{TNF}\alpha$ en un modelo *in vivo* de choque endotóxico [Garrido y cols., 2004b], lo que corrobora toda la data experimental demostrada *in vitro*. En el presente estudio se esclarece el mecanismo de acción del extracto de *M. indica* sobre el $\text{TNF}\alpha$ hasta nivel génico.

La inhibición sobre los procesos de transcripción de los genes de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y GM-CSF confirman el efecto inmunomodulador del extracto de *M. indica* sobre las funciones de los macrófagos y puede tener importante repercusión en sus futuras aplicaciones terapéuticas. Estas tres citocinas son conocidas por sus clásicas funciones proinflamatorias: la $\text{IL-1}\beta$ estimula la proliferación de células T, la quimiotaxis de macrófagos, la adhesión endotelial de los neutrófilos y monocitos circulantes y la síntesis de la COX-2 [Dinarello, 2004b]; el $\text{TNF}\alpha$ promueve la inflamación y la infiltración leucocitaria por activación de $\text{NF}\kappa\text{B}$, lo que conduce a la producción de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, receptores, enzimas y otros mediadores y activa la enzima fosfolipasa A2 con el consecuente incremento de los metabolitos del ácido araquidónico [van Puidenbroek y cols., 1999]; y el GM-CSF estimula la diferenciación irreversible de las células progenitoras de granulocitos y macrófagos, tiene poder quimiotáctico sobre diferentes tipos celulares e induce la producción de ERO en los macrófagos [Monroy y cols., 1990]. La excesiva producción de estas citocinas se manifiesta en enfermedades crónicas como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, entre otras [Medzhitov, 2001; Zhao y Schwartz, 1998; Kulmatycki y Jamali, 2001]. La reducción de la expresión de estas tres citocinas reviste especial importancia para la validación de las propiedades inmunomoduladoras del extracto de *M. indica* sobre las funciones de los macrófagos y contribuye a la explicación de sus mecanismos anti-

inflamatorios. Por otra parte, el incremento de la expresión de TGF β confirma estas propiedades anti-inflamatorias del extracto, pues esta citocina inhibe la proliferación de linfocitos T, la síntesis de GM-CSF e IL-3, la expresión del receptor del G-CSF y la síntesis de algunas citocinas pro-inflamatorias en el macrófago [Lum y cols., 1996; Huang y Huang, 2005], efectos que contribuyen a su clasificación como citocina anti-inflamatoria. Además, desempeña un papel importante en la reparación de los cartílagos y se ha demostrado que la pérdida de la capacidad de respuesta celular a esta citocina favorece la aparición de osteoartritis [Blaney y cols., 2005].

Existen varios fármacos diseñados para modular la acción de citocinas y contribuir a la mejoría terapéutica en enfermedades con desórdenes inmunopatológicos. Por ejemplo, la forma recombinante del antagonista del receptor de IL-1, denominada anakinra, previene la unión de la IL-1 a su receptor por un mecanismo clásico de antagonismo competitivo y se ha estudiado en el tratamiento de la artritis reumatoide. Igualmente, la terapia anti-TNF con fármacos como infliximab o etanercept ha sido extensamente utilizada para el tratamiento de estas enfermedades [Dinarello, 2004a]. Numerosos extractos naturales o componentes de origen natural tienen capacidad inhibitoria sobre la síntesis de citocinas. Varios terpenoides y alcaloides presentes en *Tripterygium wilfordii* tienen actividad inhibitoria a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la producción de TNF α , IL-6, IL-8, IFN γ , IL-1 β , IL-2 e IL-4 en células humanas de sangre periférica [Duan y cols., 1999; Duan y cols., 2001] y el extracto de *M. indica* tiene entre un 10-20 % de terpenoides. La fracción de polifenoles presentes en el té verde reducen la producción de TNF α y la letalidad en un modelo murino de choque séptico a 500 mg/kg [Yang y cols., 1998], mientras que efectos similares los logra el extracto de *M. indica* a dosis más baja (entre 20-200 mg/kg) y la mangiferina a 20 mg/kg [Garrido y cols., 2004a]. Las

catequinas presentes en el té verde y que algunas también están presentes en el extracto de M. indica, son capaces de disminuir la producción de IL-1 β e incrementar los niveles de IL-10 [Crouvezier y cols., 2001].

Existe un riesgo en la estrategia terapéutica que implica bloquear la síntesis de citocinas y es el decrecimiento de las defensas del huésped contra infecciones rutinarias y oportunistas [Dinarello 2004a], lo que debe ser considerado por los terapeutas en los esquemas de tratamiento a seguir en el caso de estas enfermedades donde es importante reducir la expresión de las citocinas proinflamatorias. No obstante, numerosas evidencias han demostrado que las citocinas y sus receptores están involucrados en la fisiopatología de varias enfermedades inflamatorias como la sepsis, el asma bronquial, la artritis reumatoide, la osteoartritis y la aterosclerosis, por lo que constituyen importantes dianas para el desarrollo de fármacos anti-inflamatorios de relevancia clínica [Calixto y cols., 2003]. Por tanto, a pesar del riesgo de susceptibilidad a determinadas infecciones, el bloqueo de diferentes citocinas como la IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF y otras, ha demostrado una importante mejoría en pacientes aquejados de enfermedades inmunopatológicas como la artritis reumatoide y osteoartritis [Dinarello, 2004a] y en tal sentido, el bloqueo de la producción de estas citocinas por el extracto de M. indica pudiera ser útil en el tratamiento de estas enfermedades.

La expresión de citocinas, enzimas, receptores y otras proteínas está controlada por la activación de importantes factores de transcripción nuclear. El NF κ B es uno de estos factores, el cual se encuentra localizado inactivo en el citoplasma celular por unión al complejo I κ B. Este complejo, por la estimulación de diferentes receptores celulares como TLR, TNF-R, IL-1R así como por acción de las ERO, puede activarse y traslocarse al núcleo para inducir la transcripción de genes que codifican para moléculas de adhesión, proteínas de fase aguda,

citocinas, receptores, quimiocinas, enzimas, factores de crecimiento así como algunos de sus propios componentes [Li y Verma, 2000; Leiro y cols., 2004]. Para la activación de NFκB es necesaria la fosforilación de IκB por acción de las IKK y la posterior ubiquitinación y degradación de IκB en el proteosoma. De esta forma queda libre NFκB para trasladarse al núcleo y unirse a los sitios conocidos como κB en la secuencia del promotor de genes inducibles para favorecer la transcripción y la expresión de importantes moléculas proteicas que participan en la respuesta inmune e inflamatoria [Baldwin, 1996].

Los efectos in vitro del extracto de M. indica en la activación del NFκB se estudiaron previamente mediante un ensayo de movilidad electroforética que demostró que a concentración de 25 μg/mL inhibe la degradación de IκB y por tanto evita la traslocación del NF-κB al núcleo cuando la activación es inducida por TNFα [Garrido y cols., 2005]. En los resultados del presente trabajo se demuestra que el extracto, a concentraciones entre 40-400 μg/mL, inhibe la transcripción de los genes que codifican para el NFκB sin afectar la transcripción de los genes del complejo IκB, lo cual se traduce en que se afecta la expresión de las subunidades proteicas que constituyen NFκB con una reducción de su disponibilidad en el citoplasma celular, mientras que se garantiza la expresión del inhibidor IκB.

Por otra parte, los genes que codifican para las subunidades del complejo de kinasas IKK se expresan por activación del propio NFκB [Leiro y cols., 2004; Thompson y cols., 1995]. Por tanto, la reducción de la expresión y activación (al menos la inducida por TNFα) de NFκB en el citoplasma ejercida por el extracto puede implicar una reducción en la transcripción de los genes de las kinasas IKK encargadas de degradar IκB, lo que contribuye a la permanencia del inhibidor acoplado a NFκB y por tanto evitaría su activación.

Toda esta data experimental, adicionadas a las anteriormente descritas [Garrido y cols., 2005], evidencian que el extracto de *M. indica* interfiere *in vitro* en las vías de señalización intracelular mediadas por NFκB, lo que conduce a la inhibición de la activación transcripcional de los genes controlados por este factor transcripcional, la mayoría de los cuales están implicados en la respuesta inmune e inflamatoria, lo que contribuye notablemente al esclarecimiento de sus mecanismos de acción anti-inflamatoria e inmunomoduladora. Por tanto, muchos de los resultados antes descritos para el extracto de *M. indica* en la presente investigación, como son la inhibición de la producción de NO, de la expresión de la NOS-2 y la COX-2, de la transcripción de los genes de TNFα, IL-1β, y GM-CSF en macrófagos murinos, así como otros previamente publicados como la reducción en la expresión de ICAM-1 en células endoteliales [Beltrán y cols., 2003], pueden estar relacionados con la inhibición que ejerce sobre la expresión y activación de NFκB como mecanismo molecular primario responsable de la mayor parte de los efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores demostrados *in vitro* para el extracto.

La presencia de mangiferina en el extracto puede contribuir notablemente a los efectos inhibitorios de este sobre la activación de NFκB. Este polifenol (10 μM) reduce la expresión del 40% de los genes que se expresan bajo activación de NFκB, específicamente inhibe la expresión de genes de la familia Rel/NFκB/IκB lo que implica un efecto inhibitorio sobre la transducción de señales mediadas por NFκB; genes del factor asociado al receptor de TNF (TRAF-6) lo que indica un posible bloqueo de la activación de NFκB inducida por LPS, TNFα o IL-1; genes de las citocinas IL-1α, IL-6, IL-12, TNFα, RANTES, G-CSF, GM-CSF, y M-CSF; genes de receptores como TLR6, TLR7, TLR8 y TLR9 y de moléculas de adhesión

ICAM-1, ICAM-2, ICAM-5 y L-selectina [Leiro y cols., 2004]. Por estas razones, se puede afirmar que la inhibición obtenida con el extracto de M indica sobre la expresión y activación in vitro de NFκB, así como de la expresión de los genes que codifican para las citocinas IL-1β, TNFα y GM-CSF, se deben al menos en parte, a la presencia de mangiferina en el extracto, aunque otros polifenoles como las catequinas también pueden contribuir, porque tienen demostrado efecto inhibitorio sobre la activación de NFκB [Sen y cols., 2006]. Además, recientemente se ha demostrado que las catequinas presentes en el té tienen sitios específicos de unión al ADN y que la epicatequina se une a sitios de doble cadena con la secuencia AG: CT [Kuzuhara y cols., 2006], lo que evidencia que algunos de los componentes del extracto de M. indica tienen la capacidad de unirse al ADN y esto puede estar involucrado en la inhibición de los procesos de transcripción antes descritos.

El amplio control que ejerce NFκB sobre la expresión de numerosos genes es diana de muchos fármacos anti-inflamatorios e inmunomoduladores. Por ejemplo, algunos de los efectos inhibitorios sobre citocinas y enzimas proinflamatorias ejercidos por los glucocorticoides son consecuencia de la inhibición que ejercen sobre NFκB, mediada por un incremento en la transcripción y expresión del inhibidor IκB, lo que favorece la permanencia de NFκB inactivo en el citoplasma celular [Schleimer, 2004]. Igualmente, a numerosos extractos o compuestos de origen natural se le atribuyen actividades inhibitorias sobre este factor de transcripción nuclear. Las lactonas sesquiterpénicas de Arnica montana y Ligusticum chuanxiong, el extracto de té verde (10-50 μg/mL), así como los extractos de Punica granatum L. y de la Morinda officinalis interfieren por diversas vías con la activación de NFκB en

diferentes tipos celulares [Kos y cols., 2005; Liu y cols., 2005; Lee y cols., 2005; Ahmed y cols., 2005; Kim y cols., 2005a].

La inhibición de NF-κB puede ser útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, como el choque séptico, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Alzheimer, la psoriasis y otras que involucran en sus mecanismos moleculares una importante activación de este factor transcripcional [Kaltschmidt y cols., 1997; Miagkov y cols., 1998; Han y cols., 1998; Johansen y cols., 2005], por lo que los efectos demostrados in vitro para el extracto de *M. indica* sobre la expresión y activación de NFκB, de ser comprobados in vivo, pueden ser de utilidad para el tratamiento de estas y otras patologías que posean mecanismos fisiopatológicos similares.

En resumen, los resultados de la caracterización de los efectos inmunomoduladores del extracto de *M. indica* sobre algunas funciones de los macrófagos permiten afirmar que reduce la funcionalidad de estas células, lo que se evidencia por su capacidad de inhibir in vivo la quimiotaxis e in vitro la actividad fagocítica, la transcripción de los genes que codifican para NOS-2, COX-2, TNFα, GM-CSF, IL-1β, NFκB, la producción de NO e incrementar la producción de TGFβ. Estos resultados permiten concluir que, además del efecto antioxidante y anti-inflamatorio demostrado previamente para el extracto, este posee actividad inmunomoduladora sobre las funciones de los macrófagos.

Los efectos demostrados para la mangiferina en esta investigación, permiten sugerir que está involucrada en los efectos demostrados para el extracto sobre las funciones de los macrófagos, pues en todos los experimentos en los que se evaluó, así como en los reportes científicos de sus acciones farmacológicas, hay una correspondencia de tipo cualitativa entre el efecto farmacológico del extracto y la mangiferina a dosis o concentraciones equivalentes (dosis o

concentración del extracto 10 veces superior a la de mangiferina, considerando un 10% de mangiferina en el extracto) (Tabla 8). En casi la totalidad de los experimentos, excepto en la actividad fagocítica, el efecto del extracto resultó superior al de la mangiferina, lo que sugiere que otros componentes del extracto, como los demás polifenoles, los terpenoides, los ácidos grasos o los microelementos pueden de alguna manera estar también involucrados en los efectos observados para el extracto.

Tabla 8. Comparación de los efectos de dosis o concentraciones equivalentes del extracto de *M. indica* y mangiferina (considerando un 10% de mangiferina en el extracto) sobre importantes funciones de los macrófagos.

Efecto farmacológico (% de inhibición)	Dosis o C(x)	Extracto de <i>M. indica</i>	Dosis o C(x)	Mangiferina
Inhibición <u>in vivo</u> de la quimiotaxis	100 mg/kg	88%	10 mg/kg	25%
Inhibición de la fagocitosis	100 µg/mL	53,1%	10 µg/mL	59%
Inhibición de la producción de <u>NO</u>	100 µg/mL	63,3%	10 µg/mL	41,5%
Inhibición de la expresión de la <u>NOS-2</u>	400 µg/mL	65,7%	40 µg/mL	48,1%
Inhibición de la expresión de la <u>COX-2</u>	400 µg/mL	38 %	40 µg/mL	32,5%

4.2. El extracto de *M. indica* y la mangiferina inhiben importantes mediadores de la respuesta alérgica

La alergia es un importante problema de salud en las sociedades modernas y la prevalencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado notablemente en las últimas décadas [Woolcock, 2000]. El incremento de la incidencia de las enfermedades alérgicas mantiene proporciones epidemiológicas tanto en los países desarrollados como subdesarrollados: rinitis alérgica 10-

50%, asma 5-15%, dermatitis atópica 10-20%, con una reducción de la calidad de vida de los pacientes, baja productividad e incremento de los costos médicos. Estudios realizados en Cuba revelan que el 36,4% de la población es alérgica, mientras en niños y adolescentes el porcentaje aumenta al 56%, estadística que refleja la necesidad de análisis y de reflexión pues esto constituye un problema de salud nacional [Atiénzar, 2006].

Por estas razones, se continúan las investigaciones en la caracterización fisiopatológica de las enfermedades alérgicas y en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. En tal sentido, la presente investigación estudió el posible efecto antialérgico del extracto de *M. indica* y de su principal componente la mangiferina, mediante modelos de alergia *in vivo* utilizando la OVA como alérgeno estándar reconocido por la literatura para estos tipos de modelos experimentales [Kim y cols., 2005b].

En la presente investigación se evaluaron los efectos del extracto de *M. indica* y la mangiferina en la alergia inflamatoria inducida por OVA en ratones inmunizados. Este modelo se basa en la inmunización repetida con OVA i.p en ratones y la posterior inducción de un edema plantar con el mismo alérgeno, lo que desarrolla una alergia inflamatoria mediada por mastocitos, caracterizada por activación del receptor de triptasa PAR-2, infiltración de granulocitos e incremento de la permeabilidad vascular [Vergnolle y cols., 1999]. El tratamiento con el extracto (50-500 mg/kg) redujo significativamente el edema plantar inducido por OVA, lo que evidenció *in vivo* su capacidad inhibitoria en la respuesta alérgica inflamatoria. Sin embargo, la dosis de 50 mg/kg de mangiferina no fue suficiente para conseguir un efecto inhibitorio significativo. Aunque no se ha estudiado la farmacocinética del extracto ni de la mangiferina, sí existen reportes de la baja biodisponibilidad por vía oral de la mangiferina [Geodakyan y cols., 1992] y de los polifenoles de forma general;

posiblemente debido a una pobre absorción y un amplio metabolismo en intestino [Sanugul y cols., 2005] y en hígado [Baba y cols., 2000; Zhu y cols., 2000], lo que pudiera explicar porque no se alcanzaron efectos inhibitorios significativos con esta dosis de mangiferina y siete días de tratamiento.

En este estudio se determinaron además los efectos in vivo del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la proliferación de los esplenocitos en respuesta a la estimulación in vitro con OVA en ratones sensibilizados con este alérgeno. Cuando se cultivaron in vitro en presencia de OVA los linfocitos de ratones inmunizados con este mismo antígeno, los clones específicos que se activaron durante la inmunización in vivo, respondieron a la reexposición al antígeno con el incremento del número de linfocitos específicos, proceso conocido como proliferación linfocitaria. El tratamiento in vivo con el extracto (100-500 mg/kg) y la mangiferina (50 mg/kg) redujeron la capacidad proliferativa in vitro de los linfocitos específicos para la OVA, lo que conduce a una disminución de la cantidad de linfocitos capaces de contribuir a la respuesta alérgica. El mecanismo por el cual el extracto y la mangiferina ejercen este efecto antiproliferativo no está totalmente aclarado, quizás pueda ocurrir a través de la supresión de los efectos de la IL-2 y alguna otra citocina, o el bloqueo de su receptor. Previamente, se demostró que el extracto de *M. indica* a una concentración tan baja como 10 µg/mL inhibe en un 90% la proliferación mediada por el TCR en células T humanas estimuladas con el superantígeno SBE y reduce además la expresión de CD25 en la superficie de las células T, molécula que constituye la cadena α del receptor de IL-2. De esta forma el extracto interfiere con la actividad de la IL-2, la cual es el principal estímulo para la proliferación de células T [Garrido y cols., 2005].

Los mastocitos son células muy comprometidas en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas por su capacidad secretora de importantes mediadores en respuesta a su activación dependiente o independiente de IgE. Estas células sintetizan y secretan un importante número de citocinas que regulan tanto la síntesis de IgE como el desarrollo de la inflamación eosinofílica y hoy se reconoce que pueden tener un papel central en la iniciación de la respuesta alérgica porque al ser activados por mecanismos independientes de IgE, proporcionan señales a las células B para la síntesis de IgE y para la diferenciación de los linfocitos Th2 [Kinet, 2002]. Por todas estas razones, los mastocitos son considerados por algunos autores como el eje central de la respuesta alérgica [Bradding, 2003].

La histamina es uno de los primeros mediadores liberados por los mastocitos activados y tiene efectos en la musculatura lisa, las células endoteliales, las terminaciones nerviosas y la secreción de moco. Las acciones más inmediatas de la histamina incluyen la dilatación de los vasos sanguíneos que causa una disminución de la resistencia periférica total, incremento de la permeabilidad vascular con la consiguiente extravasación de macromoléculas y líquido que conducen a la formación del edema y fallo en la presión sanguínea sistémica [Packard y Khan, 2003].

Por la importancia de la histamina como mediador molecular y de los mastocitos como mediador celular en la respuesta alérgica, se caracterizaron los efectos del extracto de M. indica y de su principal polifenol mangiferina, en la reacción cutánea inducida por histamina en ratas y en la liberación de este mediador por los mastocitos, como parte del estudio de sus propiedades inmunomoduladoras en la respuesta alérgica.

El pretratamiento durante siete días con el extracto de M. indica (50-500 mg/kg) y la mangiferina (50 mg/kg) inhibió significativamente la reacción cutánea inducida por la

histamina en ratas. La administración intradérmica de histamina en la zona dorsal de las ratas provocó un incremento de permeabilidad capilar que permitió la extravasación del colorante azul de Evans y la visualización de la reacción cutánea. El extracto y la mangiferina impidieron la extravasación del colorante y la visualización de la reacción cutánea porque inhibieron el incremento de permeabilidad capilar inducido por la histamina. Este resultado induce a pensar en un posible efecto inhibitorio del extracto sobre los receptores histaminérgicos tipo 1, lo que evitaría la interacción de la histamina con sus receptores y por tanto, el incremento de permeabilidad capilar. Los resultados obtenidos en la evaluación de la mangiferina permiten sugerir que este componente está involucrado en los efectos del extracto.

Por otra parte, el extracto de *M. indica* y mangiferina (50-250 µg/mL) inhibieron *in vitro* la liberación de histamina inducida por el compuesto 48/80 en mastocitos peritoneales de ratas, lo que evidencia que por algún mecanismo aún no esclarecido, el extracto interfiere en la desgranulación mastocitaria. Se conoce que el compuesto 48/80 incrementa la concentración de calcio intracelular, activa proteínas G e incrementa la permeabilidad de la membrana lipídica, lo que estimula la liberación de mediadores almacenados en los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos [Kim y cols., 2002], lo que puede estimular hasta un 90% de liberación de la histamina almacenada en estas células [Allansmith y cols., 1989]. Algunos fármacos antialérgicos como cromoglicato disódico ejercen su acción mediante la inhibición de la liberación de iones calcio de sus depósitos intracelulares, lo que estabiliza la membrana celular y evita la desgranulación mastocitaria [Tasaka y cols., 1986] y quizás un mecanismo similar pueda explicar la reducción en la liberación de histamina ejercida por el extracto de *M. indica*.

La IgE es esencial para el desarrollo de las reacciones alérgicas y algunos estudios demuestran incluso su producción local en enfermedades alérgicas de las vías aéreas [Smurthwaite y Durham, 2002]. Además, se conoce que pacientes con rinitis alérgica o asma atópica tienen incrementos en la expresión del receptor FcεRI en mastocitos y basófilos y que este está sobrerregulado por IgE o IL-4 [Yamaguchi y cols., 1997]. Varias de las terapias para la alergia se basan en la inhibición de la producción de IgE o de su interacción con receptores específicos. Por ejemplo, se han desarrollado anticuerpos monoclonales humanizados como omalizumab, que bloquean la unión de la IgE a su receptor y que son efectivos en el tratamiento de la rinitis alérgica, el asma y la anafilaxia [Busse y cols., 2001]. Todas estas evidencias demuestran que la IgE está altamente implicada en el desencadenamiento y mantenimiento de la respuesta alérgica. En este estudio se demostró que el tratamiento durante 21 días por vía oral con el extracto de *M. indica* (100-500 mg/kg) redujo significativamente la producción de IgE en respuesta a la inmunización con OVA en ratones (el tiempo de tratamiento de 21 días se justifica por el hecho de que en este modelo se necesitaban activar mecanismos inmunológicos que requieren un período de tiempo superior a los siete días). La presencia de mangiferina contribuye parcialmente a los efectos del extracto, pues a la dosis de 50 mg/kg también redujo la producción de IgE. El hecho de que en este modelo en ratones con 21 días de tratamiento se haya encontrado un efecto significativo para la mangiferina y no haya sido así en el modelo del edema plantar (también en ratones pero con siete días de tratamiento), sugiere que el tiempo de tratamiento puede influir en la actividad de este polifenol.

La inhibición de la proliferación linfocitaria específica a la OVA demostrada para el extracto y la mangiferina en esta investigación podría explicar sus efectos inhibitorios sobre la producción de IgE, mediante la reducción del número de células B capaces de producir esta Ig. Se demostró además que el extracto de *M. indica* (100-500 mg/kg) y la mangiferina (50 mg/kg) inhiben la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE, un modelo de reacción alérgica tipo I en ratas sensibilizadas con IgE-antiOVA. Este método se basa en la capacidad de la IgE-antiOVA administrada durante la sensibilización, de fijarse a los receptores Fcε de los mastocitos y en una reexposición al antígeno desencadenar la reacción anafiláctica a través de la liberación de sus mediadores, lo que conduce a un incremento de la permeabilidad vascular con la consecuente extravasación del colorante y la aparición de la mancha en la piel de las ratas. Por tanto, el efecto inhibitorio del extracto y la mangiferina en este modelo de respuesta anafiláctica, así como su capacidad de inhibir *in vitro* la liberación de histamina, pudieran estar relacionados con algún mecanismo que involucre la inhibición de la desgranulación mastocitaria.

Todos los resultados hasta aquí expuestos evidencian que el extracto de *M. indica* tiene propiedades inmunomoduladoras sobre la respuesta alérgica debido a la inhibición del modelo de alergia inflamatoria, la proliferación linfocitaria, la reacción cutánea a la histamina, la liberación de histamina de los mastocitos, la producción de IgE y la anafilaxia cutánea.

Además, permiten apreciar que la mangiferina está comprometida en los efectos del extracto, porque se demostró que sus efectos farmacológicos en todos los casos son de tipo inhibitorio al igual que los del extracto (Tabla 9). No obstante, el efecto de la mangiferina siempre es inferior al del extracto, lo que sugiere que otros de sus componentes como el ácido gálico, el ácido linoleico y las catequinas también pudieran estar comprometidos. El ácido gálico

disminuye la liberación de histamina inducida por IgE y por el compuesto 48/80 en mastocitos, efecto mediado por la modulación del AMPc y el calcio intracelular, efecto similar al del CGDS [Kim y cols., 2006a]. Por su parte el ácido linoleico también tiene efecto inhibitorio en la alergia por reducción de la liberación de histamina y la producción de eicosanoides [Noli y cols., 2006] y las catequinas reducen la inflamación aérea en un modelo de asma bronquial mediante la inhibición de la producción de metaloproteinasas y ERO [Kim y cols., 2006b].

Tabla 9. Comparación de los efectos de dosis o concentraciones equivalentes del extracto de *M. indica* y mangiferina (considerando un 10-20% de mangiferina en el extracto) sobre la respuesta alérgica.

Efecto farmacológico (% de inhibición)	Dosis o C(x)	Extracto de <i>M. indica</i>	Dosis o C(x)	Mangiferina
Inhibición de la proliferación linfocitaria	500 mg/kg	33,4 %	50 mg/kg	17,4 %
Inhibición de la reacción cutánea inducida por histamina	500 mg/kg	73 %	50 mg/kg	63,2 %
Inhibición de la liberación de histamina	250 µg/mL	93,8 %	50 µg/mL	42,3 %
Inhibición de la producción de IgE	500 mg/kg	53 %	50 mg/kg	46 %
Inhibición de la respuesta anafiláctica	500 mg/kg	54,3 %	50 mg/kg	35,1 %

Existen varios productos naturales que modulan de diferentes formas parámetros de la respuesta alérgica. Por ejemplo, preparaciones obtenidas de los frutos de *Rubus coreanus* (10-1000 mg/kg) inhiben el choque anafiláctico sistémico inducido por el compuesto 48/80 y a concentraciones de 1-1000 µg/mL inhibe la liberación de histamina de los mastocitos y sus concentraciones en plasma [Kim y cols., 2002], efecto similar al del extracto de *M. indica*. El

extracto acuoso de *Forsythia fructus* (100 mg/kg) reduce la reacción inflamatoria alérgica mediada por mastocitos [Kim y cols., 2003], a la misma concentración a la que el extracto de *M. indica* inhibe este mismo tipo de reacción. El Pycnogenol® (20-160 µg/mL) reduce la liberación de histamina de mastocitos peritoneales [Sharma y cols., 2003] de manera similar al efecto del extracto de *M. indica* y en el mismo rango de concentraciones. Los extractos de *Amomum xanthiodes* (Zingiberaceae) y *Artemisia iwayomogi* tienen efectos muy similares a los de *M. indica*, pues inhiben la producción de IgE, la reacción anafilaxia cutánea y la liberación de histamina de los mastocitos [Kim y Shin, 2005; Kim y cols., 2005b].

Las propiedades antialérgicas del extracto de *M. indica* pueden explicarse además por otras evidencias experimentales previamente citadas, como sus efectos antioxidantes [Sánchez y cols., 2000; Martínez y cols., 2001]. La formación y los efectos de las ERO han sido extensamente estudiados y se ha demostrado que están involucrados en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas. Por ejemplo, se ha comprobado que las ERO pueden inducir la liberación de histamina de los mastocitos por mecanismos independientes de calcio, lo que puede estar relacionado con sus efectos en la membrana celular [Di Bello y cols., 1998]. Se ha descrito además que las ERO incrementan la respuesta contráctil a la histamina en la musculatura de las vías aéreas [Sadeghi-Hashjin y cols., 1996]. Igualmente, se ha comprobado una disminución en la capacidad antioxidante total en el suero y en el fluido bronqueoalveolar de pacientes asmáticos [Henricks y Nijkamp, 2001], así como concentraciones elevadas de peroxinitritos, peróxido de hidrógeno y **NO** en el suero de pacientes con asma bronquial, rinitis alérgica y dermatitis atópica [Bowler y Crapo, 2002]. Por tanto, si las ERO son importantes en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas y la mejoría en las defensas

antioxidantes pueden ser beneficiosas para los pacientes que las padecen, el tratamiento con el extracto de *M. indica* pudiera contribuir a ello.

Los eosinófilos constituyen otra de las poblaciones celulares implicadas en la fisiopatología del asma bronquial y otras enfermedades alérgicas [Leckie y cols., 2000]. Recientes investigaciones han estudiado los efectos del extracto de *M. indica* sobre la migración y funciones de los eosinófilos. En este sentido, se diseñó un modelo murino de infestación con *Toxocara canis*, el cual induce una eosinofilia sistémica dependiente de IL-5 [Parsons y cols., 1993; Faccioso y cols., 1998] y reproduce algunas de las características del asma como el incremento de los niveles séricos de IgE [Brunello y cols., 1983] y la inflamación de las vías aéreas [Buijs y cols., 1995a,b]. En ese estudio se demostró que el tratamiento con 50 mg/kg del extracto de *M. indica* durante 18 días en ratones Balb/c infestados con *T. canis* reduce la migración de eosinófilos al fluido bronqueoalveolar y a la cavidad peritoneal, la generación de eosinófilos en la médula ósea, la eosinofilia en sangre y la producción de IL-5 [Sá-Nunes y cols., 2006], el cual es un importante factor para el reclutamiento y activación de eosinófilos [Greenfeder y cols., 2001]. Estos resultados contribuyen al esclarecimiento del mecanismo de acción antialérgica del extracto de *M. indica*.

Las propiedades inmunomoduladoras del extracto de *M. indica* en las funciones de los macrófagos, demostradas en la primera parte de la presente investigación, también pueden contribuir a la explicación de sus propiedades antialérgicas. La interferencia con la vía metabólica del NO por inhibición de la expresión de la NOS-2 puede ser importante para el tratamiento del asma, pues se ha demostrado un incremento en la exhalación de NO y en las concentraciones de nitritos en suero de pacientes asmáticos como resultado de su producción incrementada en células inflamatorias como los macrófagos [Kharitinov y cols., 1994;

Nadeem y cols., 2003]. La inhibición de la expresión de IL-1 β también puede tener repercusión en la mejoría del asma bronquial, pues se ha comprobado que la producción de esta citocina está aumentada en estos pacientes, que causa inflamación pulmonar caracterizada por infiltrados de neutrófilos y macrófagos y que contribuye al remodelamiento de las vías aéreas característico de esta enfermedad [Lappalainen y cols., 2005]. La modulación de la expresión de citocinas, como la inhibición de TNF α y la estimulación de TGF β también puede ser de utilidad para el tratamiento de la dermatitis atópica, pues se ha demostrado que el TNF α induce la producción de las quimiocinas MCP-1 y RANTES por los keratinocitos y que el TGF β ejerce acción anti-inflamatoria y participa en la reconstitución del tejido cutáneo lesionado [Leung y cols., 2003].

La inhibición que ejerce el extracto de M. indica sobre la expresión y activación de NF κ B puede tener repercusión en el tratamiento de enfermedades alérgicas, especialmente el asma bronquial, pues muchas de las proteínas inflamatorias que se expresan en las vías aéreas de los asmáticos están reguladas, al menos en parte, por este factor de transcripción. Estas incluyen: las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α que amplifican la cascada inflamatoria; el GM-CSF que prolonga la supervivencia de los eosinófilos; quimiocinas como RANTES, MCP-3 y eotaxina que reclutan eosinófilos en las vías aéreas; la enzima NOS-2 y las moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1. Se ha demostrado además un incremento en la activación de NF κ B en células epiteliales y macrófagos de las vías aéreas de pacientes asmáticos [Barnes y Adcock, 1997; 1998].

Otro hallazgo importante en el suero de los pacientes asmáticos es la deficiencia de selenio, un cofactor esencial para la glutatión peroxidasa, una de las enzimas antioxidantes más importantes en el pulmón [Barnes y Adcock, 1997; Dworski, 2000]. La suplementación con

selenio en pacientes asmáticos mejora la actividad de esta enzima y la evaluación clínica de los pacientes [Henricks y Nijkamp, 2001]. El extracto de M. indica contiene cantidades de selenio en la dosis diaria recomendada [Núñez-Sellés y cols., 2002], por lo que la administración de dicho extracto pudiera contribuir a una mejoría en los pacientes asmáticos. Por tanto, todos los argumentos anteriores soportan la afirmación de que el extracto de M. indica posee propiedades inmunomoduladoras sobre la respuesta alérgica, lo que pudiera ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades como el asma bronquial, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica, entre otras.

4.3. Consideraciones finales

Los resultados presentados constituyen importantes hallazgos que demuestran que el extracto de M. indica tiene propiedades inmunomoduladoras sobre la funcionalidad de los macrófagos y en la respuesta alérgica. Numerosos han sido los ejemplos citados en este trabajo de extractos o compuestos de origen natural con acciones similares a las demostradas para el extracto de M. indica, lo que puede sugerir adicionarlo a esa relación de productos naturales con propiedades inmunomoduladoras.

Este trabajo profundiza en la caracterización molecular de los mecanismos de acción implicados en la modulación de las funciones de los macrófagos y de la respuesta alérgica por el extracto de M. indica y constituyen un aporte importante a la base farmacológica preclínica necesaria para la realización de futuros ensayos clínicos controlados en enfermedades como la artritis reumatoide, el asma bronquial, la rinitis alérgica y la dermatitis atópica, pues el efecto inmunomodulador del extracto interfiere con varios de los mediadores celulares y moleculares implicados en la fisiopatología de estas enfermedades. El posible tratamiento de los pacientes aquejados de estas enfermedades inmunopatológicas con el extracto de M. indica, solo o como

adyuvante en otras terapias convencionales, podría repercutir en la mejoría del cuadro clínico de la patología y en la calidad de vida de los pacientes con bajo riesgo de aparición de reacciones adversas.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

6. El extracto acuoso de la corteza de *M. indica* inhibe importantes funciones de los macrófagos como la quimiotaxis in vivo, la fagocitosis y la producción de óxido nítrico in vitro en macrófagos peritoneales de rata, efecto dependiente en todos los casos de la dosis o la concentración utilizada.
7. El extracto acuoso de la corteza de *M. indica* (40-400 µg/mL) inhibe la expresión de las proteínas NOS-2 y COX-2 mediante la inhibición de la transcripción de los genes que las codifican en macrófagos peritoneales murinos. Inhibe además el proceso de transcripción de los genes de las citocinas TNF α , IL-1 β y GM-CSF y estimula el de TGF β .
8. El extracto acuoso de la corteza de *M. indica* (40-400 µg/mL) reduce la disponibilidad citoplasmática del NF κ B por inhibición del proceso de transcripción de los genes que codifican para las proteínas del complejo NF κ B sin afectar el de su inhibidor I κ B en macrófagos peritoneales murinos.
9. El extracto acuoso de la corteza de *M. indica* (50-500 mg/kg) inhibe in vivo el edema plantar inducido por OVA en ratones sensibilizados y a dosis de 100-250 mg/kg reduce además la proliferación linfocitaria específica a la OVA de los esplenocitos, lo que disminuye la cantidad de linfocitos capaces de contribuir a la respuesta alérgica.
10. El extracto acuoso de la corteza de *M. indica* (100-500 mg/kg) inhibe importantes parámetros de la respuesta alérgica como la reacción cutánea a la histamina, la producción de IgE en ratones y la respuesta anafiláctica en ratas. Igualmente, concentraciones entre 50-250 µg/mL inhiben in vitro la liberación de histamina de mastocitos peritoneales de rata.

11. La evaluación de la mangiferina demostró que sus efectos farmacológicos en todos los casos son de tipo inhibitorio al igual que los del extracto aunque generalmente en menor magnitud, lo que sugiere que la presencia de mangiferina está involucrada en los efectos farmacológicos del extracto, aunque varios de los demás componentes de la mezcla también puedan estar comprometidos.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Estudiar los efectos del extracto de M. indica en los patrones de citocinas que caracterizan la diferenciación de las células T en Th1 o Th2.
2. Evaluar la potencialidad del extracto de M. indica. en modelos experimentales in vivo de enfermedades inmunopatológicas como la artritis reumatoide y el asma bronquial.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad M, de las Heras B, Silván A, Pascual R, Bermejo O, Rodríguez B, Villar AM. Effects of furocoumarins from *Cachrys trifida* on some macrophages functions. *J Pharm Pharmacol*, 53: 1163-1168, 2001
- Abbas A, Lichtman A, Pober J. Células y tejidos del sistema inmune. En: Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Inmunología celular y molecular*. (Interamericana McGraw Hill). Madrid. pp 18-33, 1996
- Abe T, Omata T, Yoshida K, Natsumura T, Ikeda Y, Segawa Y, Matsuda K, Nagai H. Antiallergic effect of ZRC-2060: antihistaminic action. *Jpn J Pharmacol*, 66: 87-94, 1994
- Abramson S, Weaver A. Current state of therapy for pain and inflammation. *Arthrit Res Ther*, 7: S1-S6, 2005
- Aderibigbe AO, Emudianughe TS, Lawal BAS. Evaluation of the antidiabetic action of *Mangifera indica* in mice. *Phytother Res*, 15: 456-458, 2001
- Aggarwal BB. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 3: 745-756, 2003
- Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med*, 33: 1097-105, 2002
- Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *J Nutr*, 135(9): 2096-2102, 2005
- Akbari O, Stock P, DeKruyff R, Umetsu D. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*, 15: 627-633, 2003
- Ali H, Haribabu B, Richardson RM, Snyderman R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Adv Reumatol*, 81: 1-28, 1997
- Allansmith MR, Baird RS, Ross RN, Barney NP, Bloch KJ. Ocular anaphylactic induced in the rat by topical application of compound 48/80. Dose response and time course study. *Acta Ophthalmol*, 67: 145-153, 1989

- Anjaneyulu V, Satyanarayana P, Viswanadham KN, Jyothi VG, Nageswara K, Radhika P. Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochemistry*, 50: 1229-1236, 1999
- Armstrong R. The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *Int Immunopharmacol*, 1(8): 1501-1512, 2001
- Aruffo A, Hollenbaugh D. Therapeutic intervention with inhibitors of co-stimulatory pathways in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, 13(6): 683-686, 2001
- Atiérrez E. Vacunas contra el asma. Periódico Granma, Número 40, 9 de febrero, 2006
- Awe SO, Olajide OA, Oladiran OO, Makinde JM. Antiplasmodial and antipyretic screening of *Mangifera indica* extract. *Phytotherapy Res*, 12: 437-438, 1998
- Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Rad Res*, 33(5): 635-641, 2000
- Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14: 649-681, 1996
- Barnes O, Adcock I. NF κ B: a pivotal role in Asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 18(2): 46-50, 1997
- Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J*, 12(1): 221-234, 1998
- Barnes PJ, Liew FY. Nitric Oxide and astmatic inflammation. *Immunol Today*, 16(3): 128-130, 1995
- Barton B. Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes. *Expert Opin Ther Targets*, 9(4): 1-16, 2005
- Bauer H, Jung T, Tsikas T, Stichtenoth DO, Frolich JC, Neumann C. Nitric oxide inhibits the secretion of T helper 1 and T helper 2-associated cytokines in activated T cells. *Immunology*, 90(2): 205-211, 1997
- Baumgartner RA, Yamada K, Deramo VA, Beaven MA. Secretion of TNF α from a rat mast cell line is a brefeldin A-sensitive and a calcium/protein kinase C-regulated process. *J Immunol*, 153(6): 2609-2017, 1994
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*, 102(8): 840-845, 2000

- Beltrán A, Alvarez Y, Xavier F, Herranz R, Rodríguez J, Núñez A, Alonso M, Salaices M. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Eur J Pharmacol*, 499(3): 297-305, 2004
- Beltrán A, Ledón N, Romay C, Sironi M, Quintero G, Garrido G, Delgado R. Vimang® y mangiferina inhiben la expresión de ICAM-1 en células endoteliales estimuladas con citocinas proinflamatorias. *Rev Cub Invest Biomed*, 22(3): 164-172, 2003
- Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not Th2 lymphokines. *J Immunol*, 146(1): 108-113, 1991
- Blaney D, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthrit Res Ther*, 7: 1338-1347, 2005
- Bouic P, Etsebeth S, Liebenberg R, Albrecht F, Pegel K, van Jaarsveld P. Betaisosterol and betasiosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocytes proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int J Immunopharmacol*, 18(12): 693-700, 1996
- Bowler R, Crapo J. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 110 (3): 349-356, 2002
- Bradding P. The role of the mast cell in asthma: a reassessment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3(1): 45-50, 2003
- Brunello F, Genchi C, Falagiani P. Detection of larva-specific IgE in human toxocariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77: 279-280, 1983
- Buijs J, Egbers MW, Nijkamp FP. *Toxocara canis*-induced airway eosinophilia and tracheal hyperreactivity in guinea pigs and mice. *Eur J Pharmacol*, 293(3): 207-215, 1995b
- Buijs J, Lokhorst WH, Robinson J, Nijkamp FP. *Toxocara canis*-induced pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Parasite Immunol*, 16(1): 1-9, 1995a
- Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, Fowler-Taylor A, Cioppa GD, Van As A, Gupta N. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2): 184-190, 2001

- Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Med*, 69(11): 973-983, 2003
- Canty TG, Boyle EM, Farr A, Morgan EN, Verrier DE, Pohlman TH. Oxidative stress induces NF κ B nuclear translocation without degradation of I κ B α . *Circulation*, 100: 11361-11364, 1998
- Carayannopoulos LN, Yokoyama WM. Recognition of infected cells by natural killer cells. *Curr Opin Immunol*, 16(1): 26-33, 2004
- Carballo M, Conde M, Bekay RE, Martin-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirin J, Conde J, Bedoya FJ, Sobrino F. Oxidative stress triggers Stat3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem*, 274(25): 17580-17586, 1999
- Carreno B, Carter L, Collins M. Therapeutic opportunities in the B7/CD28 family of ligands and receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 5(4): 424-430, 2005
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos L, Evanson N, Tomsik J, Elton T, Simmons D. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(21): 13926-13931, 2002
- Chandrasekharan NV, Simmons D. The cyclooxygenases. *Genome Biol*, 5(9): 241-244, 2004
- Coffey M, Golden M. Extending the understanding of leukotrienes in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3: 57-63, 2003
- Coleman J. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8): 1397-1406, 2001
- Coleman J. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol*, 129(1): 4-10, 2002
- Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yaqoob P. Cytokine The effects of phenolic components of Tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokines*, 13 (5): 280-286, 2001
- Davis K, Martin E, Turko I, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 203-236, 2001
- Davis L, Kuttan G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *J Ethnopharmacol*, 71(1-2): 193-200, 2000

- Delgado R, Garrido G, Herrera B, Beltrán A, Lemus Y, Rodríguez Y, Quintero G, Lodeiro L, Tamayo D, Sironi M, Ledón N, Romay C, García D, Núñez AJ. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) as a natural antioxidant with antinociceptive and antiinflammatory properties. *Minerva Médica. Supl.* 1-3: 98-102, 2001
- Denburg L. Bone marrow in atopy and asthma: hematopoietic mechanisms in allergic inflammation. *Immunol Today*, 20(3): 111-113, 1999
- Di Bello MG, Masini E, Ioannides C, Fomusi J, Raspanti S, Bani T, Mannaioni PF. Histamine release from rat mast cells induced by the metabolic activation of drugs of abuse into free radicals. *Inflamm Res*, 47(5): 122-130, 1998
- Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*, 201(9): 1355-1359, 2005
- Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8(4): 253-265, 1997
- Dinarello CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 4(4): 378-385, 2004a
- Dinarello, C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*, 10(4): 201-222, 2004b
- Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB: IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol*, 170(9): 4457-4464, 2003
- Dombrowicz D, Capron M. Eosinophils, allergy and parasites. *Curr Opin Immunol*, 13(6): 716-20, 2001
- Dostal DE, Kempinski AM, Motel TJ, Baker KM. Absolute quantification of messenger RNA using multiplex RT-PCR. In: *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. (Siebert P and Larrick, eds). *BioTechniques Books*, Natick, MA, pp. 71-90, 1998
- Duan H, Takaishi Y, Momota H, Ohmoto Y, Taki T, Jia Y, Duan L. Immunosuppressive sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii*. *J Nat Prod*, 64(5): 582-587, 2001
- Duan H, Takaishi Y, Momota H, Ohmoto Y, Taki T, Jia Y, Li D. Immunosuppressive diterpenoids from *Tripterygium wilfordii*. *J Nat Prod*, 62(11): 1522-1525, 1999
- Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax*, 55: S51-S53, 2000
- Eisenbarth, S, Piggott D, Bottomly K. The master regulators of allergic inflammation: dendritic cells in Th2 sensitization. *Curr Opin Immunol*, 15(6): 620-626, 2003
- Ellis CN, Krueger GG. Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med*, 345(4): 248-255, 2001

- Ennist DL, Jones KH. Rapid method for identification of macrophages in suspension by acid alpha-naphthyl acetate esterase activity. *J Histochem Cytochem*, 31(7): 960-963, 1983
- Faccioli LH, Medeiros AI, Malheiro A, Pietro RC, Januário A, Vargaftig BB. Interleukin-5 modulates interleukin-8 secretion in eosinophilic inflammation. *Med Inflamm*, 7(1): 41-47, 1998
- Fernández-Morata JC, Mullol J, Fuentes M, Pujols L, Roca-Ferrer J, Pérez M, Xaubert A, Picado C. Regulation of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human nasal mucosa. Effects of cytokines and dexamethasone. *Clin Exp Allergy*, 30(9): 1275-1284, 2000
- Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol*, 7(1): 32-39, 2000
- Gámez R, Mas R, Arruzazabala ML, Noa M. Estudios de toxicidad por dosis únicas del VIMANG en roedores: Ratas Sprague Dawley y Ratones OF-1. Informe Técnico, Centro de Productos Naturales, La Habana, 134 pp, 2001
- Gámez R, Más R, Noa M, Menéndez R, Arango E, González J, Mendoza N, García H, Rodríguez Y, Goicoechea E, Mendoza S, González R. Estudio de la Toxicidad Subcrónica Oral (90 días) del VIMANG en Ratas Sprague Dawley. Informe Técnico, Centro de Productos Naturales, 40 pp, 2002
- García D, Escalante M, Delgado R, Ubeira F.M, Leiro J. Antihelminthic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytother Res*, 17(10): 1203-1208, 2003a
- García D, Lerio J, Delgado R, Sanmartin ML, Ubeira FM. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytother Res*, 17(10): 1182-1187, 2003b
- Garrido G, Blanco-Molina M, Sancho R, Macho A, Delgado R, Muñoz E. An aqueous stem bark extract of *Mangifera indica* (Vimang) inhibits T cell proliferation and TNF-induced activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Phytother Res*, 19(3): 211-215, 2005
- Garrido G, Cancino L, Quintero G, Alvarez X, Núñez Sellés AJ. QF-808: Ames and Micronuclei Assays in mouse bone marrow. *Memorias X Congr. Latinoam. Toxicol. Habana*, Nov. 161 pp, 1998
- Garrido G, Delgado R, Lemus Y, Rodríguez J, García D, Nuñez-Sellés AJ. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production

- on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG). Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacol Res*, 50 (2): 165-72, 2004a
- Garrido G, González D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Núñez-Sellés A, Morales M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res*, 15(1): 18–21, 2001
- Garrido G, Gonzalez D, Lemus Y, Delporte C, Delgado R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG((R) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine*, 13(6): 412-48, 2006
- Garrido G, González D, Lemus Y, García D, Lodeiro L, Quintero G, Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacol Res*, 50(2): 143-149, 2004b
- Geodakyan SV, Voskoboynikova IV, Tjukavkina NA, Kolhir VK, Kolesnik YA, Zjuzin VA, Glyzin VI, Sokolov SJ. Experimental pharmacokinetics of biologically active plant phenolic compounds. I. Pharmacokinetics of mangiferin in the rat. *Phytother Res*, 6(6): 332–334, 1992
- Gerlag DM, Ransone L, Tak PP, Han Z, Palanki M, Barbosa MS, Boyle D, Manning AM, and Firestein GS. The effect of a T cell-specific NF- κ B inhibitor on *in vitro* cytokine production and collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 165(3): 1652–1658, 2000
- Gibbs BF. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin Exp Med*, 5: 43–49, 2005
- Godessart N, Kunkel S. Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, 13(6): 670–675, 2001
- Gong J, Chen S. Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells. *Int Immunopharmacol*, 3(13-14): 1841–1852, 2003
- Gray D. Thanks for the memory. *Nature Immunol*, 1(1): 11-12, 2000
- Greenfeder S, Umland S, Cuss F, Chapman R, Egan R. Th2 cytokines and asthma The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res*, 2(2): 71–79, 2001
- Guevara M, Riaño A, Álvarez A, Garrido G, Páez E, Delgado R. *Mangifera indica* L. uso etnomédico en Cuba. *Rev Cub Farmacia*, 36(Suplem2): 166-167, 2002

- Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumoral, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy*, 42(6): 443-451, 1996
- Hamilton JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*, 23(8): 403-408, 2002
- Han ZN, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF-kappa B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity*, 28(4): 197-208, 1998
- Harish MS, Nagur M, Badami S. Antihistaminic and mast cell stabilizing activity of *Striga orobanchioides*. *J Ethnopharmacol*, 76(2): 197-200, 2001
- Harlan JM, Winn RK. Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med*, 30(5): 214-219, 2002
- Hashimoto Y, Arai I, Tanaka M, Nakaike S. Prostaglandin D2 inhibits IgE-mediated scratching by suppressing histamine release from mast cells. *J Pharmacol Sci*, 98(1): 90-93, 2005
- Hatada E, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 12(1): 52-58, 2000
- Heasman SJ, Giles KM, Ward C, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol*, 178(1): 29-36, 2003
- Henricks P, Nijkamp F. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Therap*, 14(6): 409-421, 2001
- Homey B, Zlotnik A. Chemokines in allergy. *Curr Opin Immunol*, 11(6): 626-634, 1999
- Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA, Yang CS. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem Pharmacol*, 62(9): 1175-1183, 2001
- Huang SS, Huang JS. TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem*, 96(3): 447-462, 2005
- Hume D. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*, 18(1): 49-53, 2006
- Issekutz TB, JM Stoltz, Van Der Meide P. Lymphocytes recruitment in delayed type hypersensitivity. *J Immunol*, 140(9): 2989-2983, 1988

- Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, ten Dijke P: Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*, 267(24): 6954-6967, 2000
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra J. Garrison J. La respuesta inmunitaria humoral. En: Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra J. Garrison J. *Inmunobiología: el sistema inmune en condiciones de salud y enfermedad* (Ediciones Massons, S.A.). Barcelona. 309-359, 2000
- Jantan I, Juriyati J, Warif NA. Inhibitory effects of xanthenes on platelet activating factor receptor binding in vitro. *J Ethnopharmacol*, 75(2-3): 287-290, 2001
- Jeong H, Koo H, Na H, Kim M, Hong S, Eom J, Kim K, Shin T, Kim H. Inhibition of TNF α and IL-6 production by aucubin through blockade of NF κ B activation in rbl-2h3 mast cells. *Cytokine*, 18(5): 252-259, 2002
- Johansen C, Flindt E, Kragballe K, Henningsen J, Westergaard M, Kristiansen K, Iversen L. Inverse regulation of the nuclear factor- κ B binding to the p53 and interleukin-8 κ B response elements in lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, 124(6): 1284-1292, 2005
- Jun CD, Choi BM, Ryu H, Um JY, Kwak HJ, et al. Synergistic cooperation between phorbol ester and IFN γ for induction of nitric oxide synthesized in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*, 153(8): 3684-3690, 1994
- Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(6): 2642-2647, 1997
- Kambu K, Tona L, Kaba S, Cimanga K, Mukala N. Antispasmodic activity of extracts proceeding of plant antidiarrheic traditional preparations used in Kinshasa, Zaire. *Ann Pharm Fr*, 48(4): 200-208, 1990
- Kamijo T, Koike K, Nakazawa Y, Takeuchi K, Ishii E, Komiyama A. Synergism between stem cell factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on cell proliferation by induction of cyclins. *Cytokine*, 19(6): 267-275, 2002
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 18: 621-663, 2000

- Katayama S, Shionoya H, Ohtake S. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol Immunol*, 22: 89-101, 1978
- Katz H. Inhibitory receptors and allergy. *Curr Opin Immunol*, 14(6): 698-704, 2002
- Khan A, Landis C, Malhotra R. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation*, 27(5): 265-280, 2003
- Kharitinov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*, 343(8890): 133-135, 1994
- Kim HW, Tai J, Greenburg AG. Nitric oxide scavenging modulates an experimental vasoplegia in-vitro. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 29(4): 263-274, 2001
- Kim IT, Park HJ, Nam JH, Park YM, Won JH, Choi J, Choe BK, Lee KT. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis*. *J Pharm Pharmacol*, 57(5): 607-615, 2005a
- Kim MS, Na HJ, Han SW, Jin JS, Song UY, Lee EJ, Song BK, Hong SH, Kim HM. *Forsythia fructus* inhibits the mast-cell-mediated allergic inflammatory reactions. *Inflammation*, 27(3): 129-134, 2003
- Kim S, Lee K, Choi Y, Lee J, Kim S, Kim SH, Shin T. Effect of *Rubus coreanus* Miq. fruits extract on compound 48/80-induced anaphylactic reactions. *Or Pharm Exp Med*, 2(1): 58-63, 2002
- Kim SH, Choi CH, Kim SY, Eun JS, Shin TY. Anti-allergic effects of *Artemisia iwayomogi* on mast cell-mediated allergy model. *Exp Biol Med*, 230(1): 82-88, 2005b
- Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, Lee SH, Shin HY, Kim DK, Shin TY. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci*, 91(1): 123-123, 2006a
- Kim SH, Park HJ, Lee CM, Choi IW, Moon DO, Roh HJ, Lee HK, Park YM. Epigallocatechin-3-gallate protects toluene diisocyanate-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *FEBS Lett*, 580(7): 1883-1890, 2006b
- Kim SH, Shin TY. *Amomum xanthioides* inhibits mast cell-mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production. *Exp Biol Med*, 230(9): 681-687, 2005

- Kinet JP. Allergy and hypersensitivity. *Curr Op Immunol*, 14: 685-687, 2002
- Korhonen R, Lahti A, Hamalainen M, Kankaanranta H, Moilanen E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol*, 62(3): 698-704, 2002
- Kos O, Lindenmeyer MT, Tubaro A, Sosa S, Merfort I. New sesquiterpene lactones from Arnica tincture prepared from fresh flowerheads of *Arnica montana*. *Planta Med*, 71(11): 1044-1052, 2005
- Kotzin BL, Falta MT, Crawford F, Rosloniec EF, Bill J, Marrack P, and Kappler J. Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci*, 97(1): 291-296, 2000
- Kruger, NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: *Meth in Mol Biol. Vol 32: Basic Protein and Peptide Protocols.* (Edicion J,M,Walker, Human Press. Inc., Totowa, N.J.), p 9-15, 1994
- Kulmatycki K, Jamali F. Therapeutic relevance of altered cytokine expression. *Cytokine*, 14(1): 1-10, 2001
- Kuzuhara T, Sei Y, Yamaguchi K, Suganuma M, Fujiki H. DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins. *J Biol Chem*, 281(25): 17446-17456, 2006
- Lahdenpohja N, Savinainen K, Hurme M. Pre-exposure to oxidative stress decreases the nuclear factor-kB-dependent transcription in T lymphocytes. *J Immunol*, 160(3):1354-1358, 1998
- Lappalainen U, Whitsett J, Wert S, Tichelaar J, Bry K. Interleukin-1 β causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32(4): 311-318, 2005
- Lartigue A, Drouot L, Jouen F, Charlionet R, Tron F, Gilbert D. Association between anti-nucleophosmin and anti-cardiolipin antibodies in (NZW \times BXS)F1 mice and human systemic lupus erythematosus. *Arthrit Res Ther*, 7(6): R1394-R1403, 2005
- Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35: 655-677, 1995

- Leckie MJ, Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 356(9248): 2144-2148, 2000
- Ledeen RW, Chakraborty G. Cytokines, signal transduction, and inflammatory demyelination: review and hypothesis. *Neurochemical Res*, 23(3): 277-289, 1998
- Lee SY, Lee JW, Lee H, Yoo HS, Yun YP, Oh KW, Ha TY, Hong JT. Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappaB and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res*, 31: 140(1-2): 45-54, 2005
- Leiro J, Alvarez E, García D, Orallo F. Resveratrol modulates the rat macrophages functions. *Int Immunopharmacol* 2(6): 767-774, 2002
- Leiro J, Arranz J, Yáñez M, Ubeira F, Sanmartín M, Orallo F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int Immunopharmacol*, 4(6): 763-778, 2004
- Leiro J, Siso MIG, Paramá A, Ubeira FM, Sanmartín ML. RFLP analysis of PCR-amplified small subunit ribosomal DNA of three fish microsporidian species. *Parasitology*, 120(2): 113-1139, 2000
- Leiro JM, Alvarez J, Arranz J, González I, Orallo F. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes. *Biochem Pharmacol*, 65(8): 1361-1371, 2003
- Letterio J, Roberts A. Regulation of immune responses by TGF β . *Annu Rev Immunol*, 16: 137-161, 1998
- Leung D, Neal J, Harvey L. New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol*, 15(6): 634-638, 2003
- Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Shelhamer JH. Corticosteroids differentially regulate secretion of IL-6, IL-8, and G-CSF by a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol*, 265(4): 360-368, 1993
- Li Q, Verma IM. NF-kB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2(10): 725-34, 2002
- Li X. Immunomodulating components from chinese medicines. *Pharm Biol*, 38: 33-40, 2000

- Liu JH, Zschocke S, Reininger E, Bauer R. Inhibitory effects of *Angelica pubescens* F. biserrata on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase. *Planta Med*, 64(9): 525-529, 1998
- Liu L, Ning ZQ, Shan S, Zhang K, Deng T, Lu XP, Cheng YY. Phthalide lactones from *Ligusticum chuanxiong* inhibit lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production and TNF-alpha-mediated NF-kappaB activation. *Planta Med*, 71(9): 808-813, 2005
- Lum ZP, Hakala BE, Mort JS, Recklies AD. Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol*, 166(2): 351-359, 1996
- Madlener S, Illmer C, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Elford HL, Krupitza G, Bernhaus A, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett*, 2006 (en prensa)
- Makare N, Bodhankar S, Rangari V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *J Ethnopharmacol*, 78(2-3): 133-137, 2001
- Martin E, Davis K, Bian K, Lee YC, Murad F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic guanosine monofosfato. *Sem Perinatol*, 24(1): 2-6, 2000
- Martínez G, Candelario-Jalil E, Giuliani A, León OS, Sam S, Delgado R, Núñez AJ. *Mangifera indica* L. extract (VIMANG) reduces ischaemia-induced neuronal loss and oxidative damage in the Gerbil brain. *Free Radical Res* 35: 465-473, 2001b.
- Martínez G, Delgado R, Pérez G, Garrido G, Núñez-Sellés AJ, León OS. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res*, 14(6): 424-427, 2000
- Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez-Sellés AJ. Effect of *Mangifera indica* L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res*, 15(7): 581-585, 2001a
- Martínez G, Rodríguez HMA, Giuliani A, Núñez Sellés AJ, Pons Rodríguez N, Fernández OS, Re L. Protective effect of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG) on the injury associated to hepatic ischemia reperfusion. *Phytother Res*, 17(3): 197-201, 2003
- Matés J, Pérez Gómez C, Nuñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32(8): 595-603, 1999

- Matés J, Perez-Gómez C, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases. *Clin Chim Acta*, 296(1-2): 1–15, 2000
- Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity: impact on the adaptative immune response. *Curr Opin Immunol*, 9(1): 4-9, 1997
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1: 135-145, 2001
- Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Baldwin AS, Makarov SS. NF-kappa B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(23): 13859–13864, 1998
- Mi-Sun K, Ho-Jeong N, Seung-Woo H, JonSik J, Un-Yong S, Eon-Jeong Lee, Bong-Keun S, Seung-Heon H, Hyung-Min K. *Forsythia fructus* inhibits the mast cell mediates allergic inflammatory reactions. *Inflammation*, 27(3): 129-135, 2003
- Miura T, Ichiki H, Hashimoto I, Iwamoto N, Kato M, Kubo M, Ishihara E, Komatsu Y, Okada M, Ishida T, Tanigawa K. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine*, 8(2): 85-87, 2001
- Miura T, Muraoka S, Ikeda N, Watanabe M, Fujimota Y. Anti-oxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacol Toxicol*, 86(5): 203-208, 2000
- Monroy RL, Davis TA, MacVittie TJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: more than a hemopoietin. *Clin. Immunology Immunopathol*, 54(3): 333-46, 1990
- Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol*, 18(4): 275–303, 1998
- Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology*, 2(2): 123-128, 2001
- Mukherjee D, Topol E. Cyclooxygenase-2: where are we in 2003? Cardiovascular risk and COX-2 inhibitors. *Arthrit Res Ther*, 5(1): 8-11, 2003
- Munakata Y, Umezawa Y, Iwata S, Dong RP, Yoshida S, Ishii T, Morimoto C. Specific inhibition of TH2-type cytokine production from human peripheral T cells by terfenadine in vitro. *Clin Exp Allergy*, 29(9): 1281–1286, 1999
- Musikacharoen T, Matsuguchi T, Kikuchi T, Yoshikai Y. NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol*, 166(7): 4516-4524, 2001

- Nadeem A, Chhabra S, Masood A, Raj H. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 111(1): 72-78, 2003
- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthrit Res*, 4 (suppl 3): S233-S242, 2002
- Navarro A, de las Heras B, Villar A. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. *Biol Pharm Bull*, 24(5): 470-473, 2001
- Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 4(4): 386-391, 2004
- Noli C, Carta G, Cordeddu L, Melis MP, Murru E, Banni S. Conjugated linoleic acid and black currant seed oil in the treatment of canine atopic dermatitis: A preliminary report. *Vet J*, 20, 2006 (en prensa)
- Núñez-Sellés A, Vélez-Castro H, Agüero-Agüero J, Gonzalez Gonzalez J, Naddeo F, De Simone F, Rastrelli L. Isolation and quantitative analyses of phenolic constituents, free sugars, fatty acids and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as nutritional supplement. *J Agric Food Chem*, 50(4): 762-766, 2002
- Oda T, Maeda H. A new single fluorimetric assay for phagocytosis. *J Immunol Meth*, 88(2): 175- 183, 1986
- Oda T, Matsumoto S. Identification and characterization of histamine H4 receptor. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 118(1): 36-42, 2001
- Olfert D, Cross BM, McWilliam A. Guide to the Care and Use of Experimental Animals, Vol. 1, 2da Edición (Edit Ontario).pp 211-220, 1993
- Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis. In Meir, DM. *Handbook of Experimental Immunology Immunochemistry*. Cap 33. (Blackwell Scientific Publications), Vol 1, 4th Edicion, 33.1-33.8, 1986
- Packard K, Khan M. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol*, 3(7): 909-920, 2003
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activities of endothelial derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122): 524-526, 1987

- Parsons JC, Coffman RL, Grieve RB. Antibody to interleukin-5 prevents blood and tissue eosinophilia but not liver trapping in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunol*, 15(9): 501-508, 1993
- Perkins DJ, Kniss DA. Blockade of nitric oxide formation down-regulates cyclooxygenase-2 and decreases PGE2 biosynthesis in macrophages. *J Leukoc Biol*, 65(6): 792-799, 1999
- Ponce-Macotela M, Navarro-Alegria I, Martinez-Gordillo MN, Alvarez-Chacon A. *In vitro* anti-giardiasis activity of plant extracts. *Rev Invest Clin*, 46(5): 343-347, 1994
- Puel A, Picard C, Kul C, Smahi A, Casanova JL. Inherited disorders of NF- κ B-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol*, 16(1): 34-41, 2004
- Reiner Z, Tedeschi-Reiner E. New information on the pathophysiology of atherosclerosis. *Lijec Vjesn*, 123(1-2): 26-31, 2001
- Reis-Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 16(1): 21-25, 2004
- Remírez D, Ledón N, González R. Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediat Inflamm*, 11(2): 81-85, 2002
- Ricciardolo FL, Timmers MC, Geppetti P, Van Schadewijk A, Brahim JJ, Sont JK, de Gouw HW, Hiemstra PS, van Krieken JH, Sterk PJ. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2): 198-204, 2001
- Robbie-Ryan M, Brown M. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 14(6): 728-733, 2002
- Rodríguez MD, Leal F, González J, García H, Goicoechea E, Guerrero S, Mendoza S, González R. Estudio teratogénico del extracto de la corteza de *Mangifera indica* L. (Vimang). Informe Técnico, Centro de Productos Naturales, 25 pp, 2002
- Roig JT. Plantas Aromáticas y Venenosas de Cuba. Segunda Edición. Editorial Científico-Técnica. La Habana, p. 610, 1988
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85(1): 9-21, 2000
- Rotelli A, Guardia T, Juarez A, de la Rocha N, Pelzar E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*, 48(6): 601-606, 2003

- Ruland J, Mak TW. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev*, 193: 93-100, 2003
- Sack MN, Smith RM, Opie LH. Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia-an anti-apoptotic perspective. *Cardiovasc Res*, 45(3): 688-695, 2000
- Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PJ, Verheyen A, Van der Linde HJ, Van Ark I, Coene A, Nijkamp FP. Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*, 153(5): 1697-1701, 1996
- Saini S, MacGlashan D. How IgE upregulates the allergic response. *Curr Opin Immunol*, 14(6): 694-697, 2002
- Saliou C, Valacchi G, Rimbach G. Assessing bioflavonoids as regulators of NFκB activity and inflammatory gene expression in mammalian cells. *Methods Enzymol*, 335: 380-387, 2001
- Sánchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Davison GP, León-Fernández OS. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res*, 42(6): 565-573, 2000
- Santamarina MT, Leiro J, Baltar P, Romarís F, Sanmartín ML, Ubeira FM. Requirements for the induction of cross-reactive anti-*Trichinella* IgE antibodies in mice. *Parasitol Res*, 79(1): 63-66, 1993
- Sanugul K, Akao T, Li Y, Kakiuchi N, Nakamura N, Hattori M. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. *Biol Pharm Bull*, 28(9): 1672-1678, 2005
- Sá-Nunes A, Rogerio A, Medeiros A, Fabris V, Andreu G, Rivera DG, Delgado R, Faccioli L. Modulation of eosinophil generation and migration by *Mangifera indica* L. extract (Vimang®). *Int Immunopharmacol*, 6: 1515-1523, 2006
- Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol*, 71(1-2): 23-33, 2000
- Schleimer RP. Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc*, 1(3): 222-230, 2004

- Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med*, 191(7): 1233-1240, 2000
- Sen P, Chakraborty PK, Raha S. Tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate impedes the anti-apoptotic effects of low-grade repetitive stress through inhibition of Akt and NFkappaB survival pathways. *FEBS Lett*, 580(1): 278-284, 2006
- Seo W, Pae H, Oh G, Chai K, Kwon T, Yun Y, Kim N, Chung H. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophages cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol*, 76(1): 59-64, 2001
- Sharma S C, Sharma S, Gulati OP. Pycnogenol® inhibits the release of histamine from mast cells. *Phytother Res*, 17(1): 66-69, 2003
- Shimizu M, Deguchi A, Joe AK, Mckoy JF, Moriwaki H, Weinstein IB. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *J Exp Ther Oncol*, 5(1): 69-78, 2005
- Simmons D, Buckley C. Some new and not so new, anti-inflammatory targets. *Curr Opin Pharmacol*, 5: 394-397, 2005
- Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2(3): 231-239, 2002
- Snijdwint FGM, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol*, 150(12): 5321-5329, 1993
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21: 335-376, 2003
- Takeda M, Mori F, Yoshida A, Takamiya A, Nakagomi S, Sato E, Kiyama H. Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats. *Diabetology*, 44(8): 1043-1050, 2001
- Tamayo D, Mari E, González S, Guevara M, Garrido G, Delgado R, Marchioli R, Núñez AJ. Vimang as natural antioxidant supplementation in patients with malignant tumours. *Minerva Médica*, 92 (Suppl.1): 95-97, 2001
- Tasaka K, Mio M, Okamoto M. Intracellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann Allergy*, 56: 464-469, 1986

- Temkin V, Levi-schaffer F. Mechanism of tumour necrosis factor alpha mediated eosinophil survival. *Cytokine*, 15(1): 20–26, 2001
- Testa B, Mesoletta C, Mosti MR, Mesoletta M, Testa D, Motta G. Changes in serum interferon- γ , interleukin-4, and interleukin-12 cytokine levels in anti-histamine type 2-treated allergic rhinitis patients. *Laryngoscope*, 111(2): 236–239, 2001
- Thompson JE, Phillips R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell*, 80(4): 573-582, 1995
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFKappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol*, 126(3): 673-680, 1999
- van Puidenbroek A, Wissink S, van der Saag P, Peppelenbosch M. Phospholipase A2 inhibitors and leucotriene synthesis inhibitors block TNF-induced NF κ B activation. *Cytokine*, 11(2): 104-110, 1999
- Vergnolle N, Hollenberg MD, Sharkey KA, Wallace JL. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2) activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol*, 127(5): 1083-1090, 1999
- Wagner H. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity (recent advances). *Pure Appl Chem*, 62: 1217-1222, 1990
- Warringa RA, Koenderman L, Kok PT, Kreukniet J, Bruijnzeel PL. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood*, 77(12): 2694-700, 1991
- Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol*, 12(6): 624–631, 2000
- Whan J, Gon B, Kee Y, Woo J, Kyoung H, Hong S, Young H, Ro K, Woo H. Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW264.7 macrophages through the inactivation of NF κ B. *Brit J Pharmacol*, 133(4): 503-512, 2001

- Wild MK, Huang MC, Schulze-Horsel U, van der Merwe PA, Vestweber D. Affinity, kinetics and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1. *J Biol Chem*, 276(34): 31602–31612, 2001
- Woerdenbag HJ, Merfort I, Pabreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, Van Uden W, Pras N, Kampinga HH, Konings AW. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Med*, 60(5): 3434-3437, 1994
- Woolcock AJ. The burden of asthma. *ACI Int Suppl*, 1: 53-56, 2000
- Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ. IgE enhanced mouse mast cells FcεRI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med*, 185(4): 663-672, 1997
- Yamamura H, Kohno S, Ohata K. Effect of SN-408 (salmeterol hydroxynaphthoate) on passive cutaneous anaphylaxis and anaphylactic chemical mediator release in rats and guinea pigs. *Jpn J Allergol*, 40(7): 669-679, 1991
- Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in murine model. *J Nutr*, 128(12): 2334-2340, 1998
- Yi JM., Kim MS, Seo-Wlee K, Yook CS, Kim HM. *Acanthopanax senticosus* root inhibits mast cell-dependent anaphylactic. *Clin Chim Acta*, 312(1-2): 163-168, 2001
- Yoosook C, Bunyaphatsara N, Boonyakiat Y, Kantasuk C. Anti-*Herpes simplex* virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomedicine*, 6(6): 411-419, 2000
- Youl J, Ra A, Sook E, Up K, Hwan M. Immunomodulatory effect of arctigenin, a lignan compound, on tumour necrosis factor and nitric oxide production and lymphocytes proliferation. *J Pharm Pharmacol*, 51(11): 1267-1276, 1999
- Yurt RW, Leid RW, Austen KF. Native heparin from rat peritonealmast cells. *J Biol Chem*, 252(2): 518-521, 1977
- Yuuya S, Hagiwara H, Suzuki T, Ando M, Yamada A, Suda K, Kataoka T, Nagai K. Guaianolides as immunomodulators. Synthesis and biological activities of dehydrocostus lactone, mokko lactone, eremanthin and their derivatives. *J Nat Prod*, 62(1): 22-30, 1999

Zhao B, Schwartz JP. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res*, 52(1): 7–16, 1998

Zhu M, Chen Y, Li RC. Oral absorption and bioavailability of the catechins. *Planta Med*, 66(5): 444-447, 2000