

## SUMARIO

<b>Editorial</b>	99
<b>La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio?</b> Salvador Cañigüeral	101
<b>Ginseng</b> M.ª Victoria Naval López M.ª Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado M.ª Emilia Carretero Accame Ángel M.ª Villar del Fresno	123
<b>La corteza de sauce como analgésico y antirreumático</b> Beat Meier	141
<b>Actividad inmunomoduladora de las plantas (I)</b> Ceferino Sánchez Mahabir Gupta Ana Isabel Santana	151
<b>Prohibición de uso del PC-Spes</b>	165
<b>Condiciones especiales para la importación de anís estrellado procedente de terceros países</b>	167
<b>Sociedad Española de Fitoterapia</b>	171
<b>Biblioteca</b>	173
<b>Congresos, reuniones, actividades</b>	181
<b>V Coloquio Europeo de Etnofarmacología</b>	183
<b>Instrucciones para los autores</b>	185

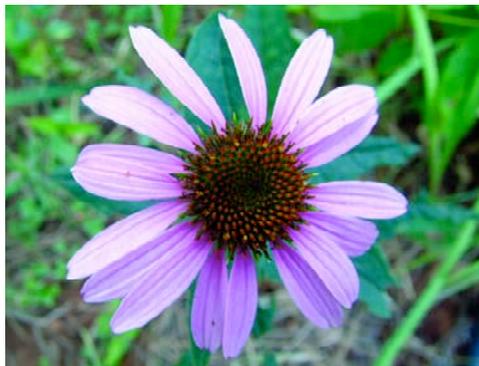


FIGURA 1. *Echinacea purpurea*.  
Foto: Bernat Vanaclocha.

# Actividad inmunomoduladora de las plantas (I)

Ceferino Sánchez  
Mahabir Gupta  
Ana Isabel Santana

---

## Abstract

Compounds with pharmacological activity on the immune system are of interest due to the therapeutic potential of such compounds for the treatment of many diseases. Plants and their metabolites can be an important source of novel immunomodulator compounds. There are many experimental methods in vivo and in vitro for the screening and evaluation of compounds and plant extracts which are important to be known and used in order to discover the effects and possible mechanism of action. There are different alternatives, to choose plants with potential effects on the immunological system, to evaluate them in the laboratory. Immunomodulating effects can be found in different chemical groups of compounds. This paper includes a comprehensible bibliographical review of plants with immunomodulating activity.

## Key words

Immunomodulation, bioassays, screening, identification, chemical groups, immunostimulation, immunosuppression.

## Resumen

Los compuestos con actividad farmacológica sobre el sistema inmune son de gran interés por su potencial terapéutico en el tratamiento de diferentes patologías. Las plantas y sus metabolitos pueden ser una fuente importante de compuestos inmunomoduladores novedosos. Hay una variedad de métodos experimentales in vivo e in vitro para el cribado y evaluación de la actividad inmunomoduladora de los compuestos y extractos, que es importante conocer y usar para dilucidar los efectos y posibles mecanismos de acción. Existen diferentes estrategias para seleccionar las plantas con potencial efecto sobre el sistema inmunológico, para su evaluación en el laboratorio. Diferentes grupos químicos pueden tener efectos inmunomoduladores. El trabajo incluye una amplia revisión bibliográfica de las plantas con actividad inmunomoduladora.

## Palabras clave

Inmunomodulación, bioensayos, cribado, identificación, grupos químicos, inmunestimulación, inmunosupresión.



## Introducción

Actividad Inmunomoduladora es un término general que indica un efecto biológico o farmacológico sobre los factores humorales o celulares que actúan en la respuesta inmune. Cada factor y cada sistema funcional involucrado en la respuesta inmune pueden ser influenciados por varias vías. El efecto que se obtiene puede ser específico o inespecífico. Algunos agentes pueden tener ambos efectos. Debido a que las interacciones reguladoras entre los inmunofactores humorales y celulares influyen en el curso de los procesos funcionales de la respuesta inmune, ésta puede ser muy variada.

El efecto neto *in vivo* de un inmunomodulador determina si la acción es estimulante o supresora. Los mecanismos de retroalimentación negativos parecen ser frecuentes en el sistema inmune. Así, la "inmunosupresión puede resultar de la estimulación de células inhibitorias o factores humorales, o de la inhibición de células efectoras o de factores humorales activadores. Por otra parte, la "inmunoestimulación" se logra por la estimulación de células efectoras o la producción de sus inductores metabólicos, y posiblemente también por la inhibición de factores que limitan la inmunogenicidad.

Los productos naturales y sus componentes pueden ser una fuente importante de moléculas con propiedades inmunomoduladoras interesantes. En la primera mitad de los años 70, el interés por la inmunomodulación estuvo prácticamente circunscrito al campo de la inmunología. En los años finales de esa década, creció el interés por las actividades inmunomoduladoras entre los grupos de investigación, tanto de farmacólogos como de cirujanos e inmunólogos. Durante los años 70 y 80 se publicaron algunos artículos sobre las propiedades inmunomoduladoras de compuestos aislados de hongos y plantas y los primeros avances en inmunofarmacología fueron revisados en 1982<sup>(1)</sup>.

Sobre la actividad inmunomoduladora de los productos naturales, se han publicado un elevado número de trabajos<sup>(2-17)</sup> que sugieren que las plantas o sus componentes pueden ser importantes en el descubrimiento de nuevos fármacos innovadores con actividad inmunomoduladora y posiblemente en dilucidar mecanismos de acción novedosos.

La lista de agentes inmunológicamente activos que se investigan en la actualidad es extensa<sup>(18)</sup>. Para este grupo de sustancias, de naturaleza muy variada, ha sido propuesto el término "Modificador de la Respuesta Biológica" (BRM). Estas sustancias incluyen agentes químicamente definidos, extractos y preparaciones de origen microbiano, de plantas superiores y de sustancias producidas por procedimiento de ADN recombinante<sup>(19)</sup>. Funcionalmente estos agentes pueden dividirse entre aquellos que actúan sobre las células T, células B, células NK o macrófagos o aquellos que son específicos o inespecíficos en su acción.

Se ha acumulado una amplia información sobre la actividad inmunofarmacológica de tales compuestos, pero se conoce muy poco sobre su comportamiento farmacocinético. Para la mayoría de ellas, incluidas las utilizadas en fitoterapia, no existe información completa. Esto se debe principalmente a la ausencia de métodos de ensayo sensitivos para determinar su presencia en bajas concentraciones en los tejidos biológicos<sup>(20)</sup>. Sin embargo, aún con el limitado conocimiento disponible, existen posibles aplicaciones clínicas. Es así como muchos BRM y drogas con efecto específico y no específico sobre el sistema inmune, han sido investigados y aprobados por las agencias regulatorias gubernamentales en el Japón y Alemania<sup>(21, 22, 23)</sup>.

Sobre estos productos y sus efectos se tienen informes muy positivos, pero así mismo existe información crítica y advertencias sobre sus limitaciones. Existen algunos factores que dificultan el desarrollo de estas sustancias: muchas preparaciones no han sido completamente caracterizadas o su estandarización ha sido insuficiente; algunos compuestos han demostrado ser tóxicos o producen efectos secundarios graves, por lo que existe gran dificultad en determinar la dosis óptima y el modo apropiado de administración; y finalmente resulta difícil evaluar el estado del sistema inmune de un paciente y a partir de allí proponer una terapia inmune apropiada utilizando un modificador de la respuesta inmune.

A pesar de esta situación, en varios países, tal como se ha indicado, la experiencia terapéutica acumulada ha sido la base para la elaboración de formulaciones farmacéuticas que se utilizan con éxito en la práctica médica actual. Para estas preparaciones, se han utilizado esencialmente extrac-

tos vegetales. Los géneros de plantas medicinales más empleados para este propósito han sido: Echinacea (FIGURA 1), Arnica, Baptisia, Calendula (FIGURA 2), Eupatorium, Thuja y Viscum<sup>(24, 25)</sup>. Ellas contienen toda una serie de compuestos de alto y bajo peso molecular cuya naturaleza química sólo se conoce parcialmente.

### Evaluación de la actividad inmunomoduladora

La literatura concerniente a los ensayos y métodos para comprobar la actividad inmunomoduladora es extensa. Estos incluyen técnicas y aproximaciones metodológicas diversas.

De acuerdo con reconocidos investigadores sobre este tema<sup>(17)</sup>, la forma más rápida para detectar compuestos inmunoestimulantes *in vivo* es a través de experimentos con modelos de animales infectados o inmunodeprimidos. Estos modelos pueden indicar si un agente o es capaz de mejorar la respuesta inmune y hasta qué punto puede antagonizar una infección severa o letal, y de esa manera, comprobar el potencial terapéutico o la capacidad protectora del mismo. Además, en el modelo de animal inmunodeprimido se puede detectar si una droga o compuesto bajo estudio puede restaurar el sistema inmune parcialmente deteriorado.

Sin embargo, para el cribado masivo de compuestos, los bioensayos *in vitro* son los más adecuados, pues además de su relativo bajo costo, pueden orientar sobre los posibles mecanismos de acción de las sustancias investigadas. Por otra parte, como los resultados obtenidos *in vitro* no se correlacionan necesariamente con los resultados *in vivo*, es necesario confirmar los resultados obtenidos *in vitro* con modelos *in vivo*. Lo mismo sucede a la inversa, es decir, es posible que un resultado positivo *in vivo* no pueda ser comprobado o sustentado *in vitro*. Esto puede suceder cuando uno o varios tipos de células o sistemas mediadores, no todos ellos presentes en un sistema celular *in vitro*, son responsables del efecto *in vivo*. En consecuencia, por lo general, es necesario realizar varios ensayos *in vitro* ya que no hay un sistema maestro o una célula única que regule y gobierne las diversas vías inmunológicas.

Es importante examinar cuidadosamente si todos los datos obtenidos con modelos *in vitro*, son relevantes para hacer un juicio apropiado de la situación *in vivo*. Como se demostró con diferen-



FIGURA 2. *Calendula officinalis*. Foto: Carlos E. Hermosilla.

tes polisacáridos, la estimulación *in vitro* de distintos componentes del sistema inmune no correspondió a los resultados *in vivo*<sup>(26)</sup>. La exploración de las funciones inmunológicas afectadas por una droga puede, en cada caso, seguir una metodología lógica, utilizando varios sistemas *in vivo* e *in vitro*. Estos sistemas evaluarán, por una parte, el efecto de la droga en el sistema total, y por otra, permitirán la localización de dianas celulares o moleculares.

En resumen, la estrategia que generalmente se sigue en los programas de cribado, es seleccionar una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo* que guarden una clara correlación con las condiciones clínicas. Los criterios que se usan para la selección de los bioensayos son la relevancia e importancia de las funciones o disfunciones efectoras inmunes, bajo condiciones normales y en condiciones patológicas. Así, la elección de bioensayos relevantes y funcionales para la investigación y el desarrollo de sustancias inmunomoduladoras pueden y deben estar orientados a la enfermedad.

Entre los ensayos *in vitro* disponibles en la actualidad, los más importantes parecen ser aquellos que permiten determinar el estado funcional y la eficiencia del sistema de los fagocitos mononucleares. Se consideran de segunda elección las pruebas que miden la actividad sobre el sistema del complemento y sobre la población de linfocitos T.

### Cribado para detectar actividad inmunomoduladora

Recientemente, Wagner y Jurcic<sup>(27)</sup> han publicado una selección de bioensayos usados para el cri-



bado de extractos vegetales y compuestos naturales como inmunoestimulantes y antiinflamatorios. Estos autores han establecido un sistema bien definido de métodos, que incluyen como blanco o dianas a granulocitos, macrófagos, linfocitos T, células NK y el sistema complemento, entre otros. Estos modelos también se usan en ensayos preclínicos. En este contexto la citometría de flujo representa un avance metodológico para la selección de distintos sistemas celulares, además del seguimiento de pacientes sometidos a inmunoterapia.

Simultáneamente, Beretz y Cazenave<sup>(28)</sup> han publicado ensayos para el cribado de productos naturales, con efectos en la función plaquetaria *in vitro* e *in vivo*. Este último artículo incluye ensayos sobre la función plaquetaria utilizando modelos de ligandos a receptores y enzimas plaquetarias. Usando parámetros inmunológicos, Kiso y Hikino<sup>(29)</sup> han descrito ensayos *in vitro* con hepatocitos, así como modelos hepáticos *in vivo*, en ratones. Un artículo reciente sobre ensayos basados en unión a receptores (para IL-1 e IL-2), en actividad enzimática (fosfolipasa extracelular), adhesión celular y liberación de mediadores inflamatorios (leucotrieno B4) ha sido publicado por Devlin et al<sup>(30)</sup>.

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* con células B y T y los ensayos con anticuerpos, citoquinas y células no linfoides, han sido revisados por Coligant et al<sup>(31)</sup>.

Por otra parte, se han publicado artículos excelentes sobre la medición de actividades relacionadas con las células involucradas en la inflamación, los mediadores inflamatorios, las propiedades quimiotácticas y las células y enzimas que intervienen en la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>(32-36)</sup>.

En la práctica la actividad inmunomoduladora *in vitro* se mide a diferentes niveles, desde los efectos sobre partes de órganos, preparaciones con células enteras (por ejemplo: leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos, macrófagos, linfocitos), hasta los efectos en sistemas enzimáticos y con técnicas de unión a receptores. Dependiendo del tipo de prueba realizada, los efectos específicos que pueden medirse en los ensayos *in vitro*, tienen sus limitaciones en relación con su capacidad de predecir condiciones *in vivo*. Además, los resultados positivos obtenidos en animales, como se sabe, no es una garantía de un efecto en el humano.

Finalmente, para detectar y definir la actividad de un inmunomodulador se necesitan pruebas específicas y apropiadas. El alcance de tales pruebas debería ser capaz de definir los blancos o dianas celulares, establecer la curva dosis-respuesta, predecir la actividad *in vivo* y evaluar la toxicidad. Además, deberían poder analizarse la visión bioquímica de los receptores, las señales transmembrana y otros aspectos del mecanismo de acción.

### Bioensayos en la búsqueda de actividad inmunomoduladora de los productos naturales

Algunos de los ensayos usados más frecuentemente para detectar la actividad inmunomoduladora de extractos aparecen en la TABLA 1, se incluyen en cada caso las referencias pertinentes.

### Selección de los productos naturales

Los conceptos relacionados con el sistema inmune y los inmunomoduladores, en el contexto en que son usados actualmente, no son reconocidos en la medicina tradicional de la India, China, América o en la medicina popular en general. Se puede asumir, sin embargo, que las plantas usadas en la medicina tradicional por su actividad antibacteriana, antiviral, antimicótica y antitumoral pueden ser candidatos interesantes para su evaluación como agentes inmunomoduladores. La necesidad de no basarse exclusivamente en el método aleatorio, o en la biodiversidad, para la búsqueda de actividad inmunomoduladora de las plantas y mejorar la elección de candidatos de fuentes tradicionales, a través de un proceso más científico, se recoge en la propuesta de Labadie<sup>(73)</sup>, que basa la selección de productos naturales para la búsqueda y desarrollo de agentes inmunomoduladores en dos fuentes diferentes de información.

La primera se genera a partir de estudios taxonómicos, quimiotaxonómicos, fitoquímicos e inmunofarmacológicos y, hasta donde es posible, de datos clínicos de compuestos individuales de las plantas y de extractos vegetales estandarizados. La segunda fuente se deriva de la lectura de textos clásicos de medicina y farmacia, entrevistas orales y consultas a curanderos, unido al estudio de los sistemas de medicina tradicional. De acuerdo con Labadie, es de vital importancia un balance racional entre estas dos fuentes, ya que la mayoría de los estudios relacionados con los



### Bioensayos para determinar actividad inmunomoduladora

1. Fagocitosis granulocítica *in vitro* <sup>(27, 37-39)</sup>

---

2. Ensayo de quimioluminiscencia <sup>(40-43)</sup>

---

3. Ensayo de quimiotaxis <sup>(44-46)</sup>

---

4. Fagocitosis *in vivo*, prueba de aclaramiento de carbón <sup>(47,48)</sup>

---

5. Ensayo de proliferación linfocítica <sup>(49-57)</sup>

---

6. Ensayo de citotoxicidad inmunoinducida <sup>(58-64)</sup>

---

7. Ensayo de actividad sobre el sistema del complemento *in vitro* <sup>(65-68)</sup>

---

8. Ensayo para la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) <sup>(69,70)</sup>

---

9. Prueba de la expresión del antígeno CD69 <sup>(71)</sup> · Protección de infecciones sistémicas en ratones <sup>(72)</sup>

TABLA 1. Bioensayos para determinar actividad inmunomoduladora.

inmunomoduladores derivados de fuentes naturales, hasta ahora, presentan enfoques con un pobre conocimiento de la medicina tradicional y las prácticas etnomédicas.

Para que un programa de investigación sobre compuestos inmunomoduladores de origen natural pueda tener éxito, el conocimiento empírico, base de las prácticas etnomédicas, parece ser tan importante como los datos puramente botánicos, biológicos, fitoquímicos e inmunofarmacológicos. En vista de lo anterior se ha recomendado <sup>(5,74)</sup> realizar una encuesta etnofarmacognóstica, previa a los estudios experimentales inmunofarmacológicos. En las encuestas etnofarmacognósticas se utilizan cuestionarios que cubren cuatro áreas integradas en la medicina tradicional y folclórica: etnobotánica, etnofarmacia, etnofarmacología y etnomedicina. Para minimizar los problemas es necesario que antropólogos, lingüistas y filólogos colaboren en las encuestas. Las encuestas etnofarmacognósticas bien realizadas aumentan la probabilidad de identificar especies interesantes y permiten conocer el tipo de preparación etnomédica, que condicionan los posibles constituyentes activos. Además, ayudan a seleccionar las pruebas inmunofarmacológicas más apropiadas e identificar la categoría farmacoterapéutica o las indicaciones más importantes.

En los estudios de campo las preguntas pueden centrarse en preparaciones tradicionales o las terapias de una amplia diversidad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes -tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico-

infecciones, enfermedades dermatológicas, quemaduras y heridas. Es relevante también preguntar sobre terapias tradicionales que vitalizan, fortifican y estimulan funciones del cuerpo y aumentan la resistencia a las enfermedades. También se pueden encontrar candidatos potenciales para su estudio como inmunomoduladores en las plantas que se usan específicamente para convalecencia y dietas.

#### Aislamiento e identificación de compuestos inmunomoduladores

Generalmente, los ensayos iniciales para evaluar la actividad inmunomoduladora se realizan con extractos similares a los que se usan en la medicina tradicional o popular. Los extractos crudos representan, por lo tanto, un paso lógico para iniciar los estudios de cribado. Debido a que el agua es el solvente más común usado en la preparación de medicamentos populares o en la medicina tradicional, lo más apropiado para iniciar la evaluación de la actividad de las plantas es usar un extracto acuoso de la planta o de una parte de ella, de acuerdo con la información obtenida en la investigación de campo preliminar. Además de extractos acuosos, también se pueden seleccionar extractos etanólicos o metanólicos en la fase inicial del cribado, aunque pueden presentar problemas en los ensayos *in vitro*, debido a su pobre solubilidad en tampones acuosos. En tales casos, las muestras pueden disolverse con ayuda de una pequeña proporción de dimetilsulfóxido.

Tras la evaluación de la actividad con los extractos crudos, el estudio se continúa siguiendo el



método de fraccionamiento guiado por la actividad y usando los procedimientos de separación más apropiados. En principio se puede usar cualquier método de fraccionamiento o separación siempre que se evite la pérdida o descomposición de los constituyentes. En el caso de inmunomoduladores potenciales los métodos de elección para el fraccionamiento de los extractos se basan en la separación por peso molecular de los componentes y en la extracción líquido-líquido. La evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad inmunomoduladora de cada fracción determinará cuál de ellas será sometida a los siguientes procedimientos de purificación y aislamiento de los compuestos activos.

No es fácil identificar la presencia de uno o más compuestos inmunomoduladores en plantas o sus preparaciones medicinales. Se pueden obtener falsos positivos debido a efectos que son no selectivos y no específicos. Algunos fitoconstituyentes pueden unirse a  $Ca^{2+}$  ó  $Mg^{2+}$  y mostrar una actividad anticomplemento falsa lo cual puede enmascarar la presencia de otros compuestos con actividad específica. Algunos constituyentes polifenólicos pueden desactivar proteínas en forma no selectiva. En presencia de tales compuestos, que interfieren en los bioensayos, la actividad específica de otros constituyentes es difícil de detectar. Los falsos positivos también se obtienen cuando la actividad demostrada está basada en la citotoxicidad de extractos crudos de plantas sobre células del sistema inmune. La diversidad de estructuras moleculares en los extractos crudos presenta una situación impredecible en el cribado inicial.

La actividad inmunomoduladora *in vitro* en la fase de cribado con extractos vegetales se establece ensayando un rango de concentraciones apropiadas. Una vez se establece la actividad en una relación de dosis-respuesta, algunos bioensayos permiten sacar conclusiones preliminares sobre la selectividad o especificidad del efecto. Por ejemplo, un extracto crudo que exhibe un efecto inhibidor potente sobre la vía clásica de activación del complemento y ninguna actividad sobre la vía alternativa del sistema del complemento sugiere la interferencia con C1, C2, C3, C4, IgG, IgM o las formas agregadas de estas inmunoglobulinas. Los estudios mecanísticos posteriores se enfoca-

rán sobre la selectividad de cada uno de estos inmunofactores para determinar la interacción específica.

### Compuestos inmunomoduladores

En la TABLA 2 se presenta una relación de compuestos de diferentes grupos químicos con actividad inmunomoduladora.

Desde el punto de vista molecular, los compuestos con actividad inmunomoduladora, pueden pertenecer a cualquier clase química estructural. Se han identificado compuestos activos que pertenecen a los siguientes grupos de sustancias: carbohidratos, terpenos, esteroides, fenoles de diferentes clases biogenéticas, cumarinas, aminoácidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, alcaloides y otras sustancias orgánicas nitrogenadas sobre las cuales hacemos a continuación unos breves comentarios.

### Carbohidratos

Los carbohidratos representan un grupo importante de agentes inmunomoduladores. En estudios orientados inmunológicamente, varios polisacáridos (zymosan, inulina), polisacáridos sulfatados (dextranosulfato, heparina), lipopolisacáridos libres de proteínas (LPS) y glicoproteínas (lectinas) han mostrado actividad inmunomoduladora interesante. La investigación sobre monosacáridos indica que la L-fucosa y la L-ramnosa son capaces de inhibir la actividad de linfocinas *in vitro*, y de suprimir las manifestaciones de la inmunidad celular *in vivo*. Además, L-fucosa, L-ramnosa y el  $\alpha$ -metil-D-manósido son capaces de bloquear el factor supresor soluble (SSF) de los linfocitos. Recientemente han aparecido artículos de revisión y capítulos de libros que tratan sobre este tema con más detalle <sup>(2, 4, 6, 8, 143, 144)</sup>.

Un estudio sobre polisacáridos tipo pectina, extraídos y purificados de *Hibiscus sp.*, *Ginkgo sp.* y *Cassia sp.* han demostrado una pronunciada actividad en los ensayos de linfoproliferación, inducción de macrófagos citotóxicos e incremento en la fagocitosis <sup>(145)</sup>.

Por otra parte, los glucanos antitumorales de origen fúngico no estimulan la proliferación de linfocitos. La inducción de macrófagos citotóxicos se obtiene solamente con polisacáridos de *Senna* e *Hibiscus* altamente ácidos, pero no con glucanos y fructanos neutros. Un efecto similar fue obteni-



do con polímeros pécticos ramificados y altamente ácidos en el ensayo de fagocitosis <sup>(145)</sup>.

Muchos polisacáridos de plantas superiores han sido examinados por Wagner <sup>(146)</sup>. Estos polisacáridos causan un aumento en la fagocitosis de los granulocitos y macrófagos e inducen la producción de TNF, interferón, e interleucinas <sup>(147)</sup>. El efecto sobre la actividad fagocitaria pudo ser correlacionado con las distintas estructuras de los polisacáridos, tales como xiloglucanos, arabinogalactanos ácidos, 4-O-metilglucuronoxilanos y poligalacturonanos altamente ácidos.

Varios de estos polímeros son aniónicos, con una estructura altamente ramificada y un peso molecular de 50.000 o mayor. Se asume que sus propiedades estructurales y las conformaciones específicas contribuyen al modo de interacción con distintos sistemas inmunológicos. Aún no está claro, cómo estos polímeros, con un peso molecular relativamente alto interactúan *in vivo* con el sistema inmune, ya que no se absorben completamente después de su administración oral.

Los polisacáridos aislados de hongos, principalmente glucanos y algunos mananos, han demostrado propiedades inmunomoduladoras interesantes. El peso molecular de estos polisacáridos oscila entre 5 y 1000 kDa. Un aspecto importante de estos polisacáridos activos es la presencia del enlace β, 1-3. Son compuestos típicos de este grupo el lentinano, aislado de *Lentinus edodes* Besk (FIGURA 3), el esquizofilano de *Schizophyllum commune* y el polisacárido H11 de micelios de *Poria cocos*. Estos glucanos neutros han demostrado actividad antitumoral.

Las especies de plantas más importantes con las cuales se han realizado numerosos estudios bio-dirigidos para aislar sus polímeros bioactivos incluyen las siguientes: *Echinacea purpurea* <sup>(148-151)</sup>, *Angelica acutiloba* <sup>(152, 153)</sup>, *Aloe vera* <sup>(154, 155)</sup>, *Picrorrhiza kurroa* <sup>(156-158)</sup> y *Viscum album* <sup>(159-161)</sup>.

### Péptidos, proteínas y glicoproteínas.

Las proteínas, en forma cruda o pura, desencadenan reacciones inmunológicas. De hecho, cualquier fármaco peptídico o protéico es potencialmente antigénico. Teniendo en cuenta que muchas moléculas y mediadores involucrados en



FIGURA 3. *Lentinus edodes*. Foto: Carlos E. Hermosilla.

la respuesta inmune son proteínas, péptidos o glicoproteínas, es de esperar que los productos naturales de este tipo puedan fácilmente interferir o interactuar con los inmunofactores y el sistema inmune. En efecto, muchos péptidos diferentes pueden unirse al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II tanto *in vitro* como *in vivo*.

Sobre el particular hay artículos de gran interés en la literatura científica <sup>(2, 162-164)</sup>. *Viscum album* (FIGURA 4) y *Jatropha multifida* han sido dos de las plantas más extensamente investigadas en este campo <sup>(165-168)</sup>.

Las glicoproteínas llamadas lectinas, son los inmunostimulantes más importantes de este grupo. Fueron primeramente aisladas de plantas y denominadas fitohemoaglutininas debido a su habilidad de aglutinar células y glicoconjugados. Las lectinas también se han aislado de hongos, bacterias e invertebrados así como de animales superiores y humanos. Además de sus propiedades de hemoaglutinación y su valor diagnóstico en la determinación de grupos sanguíneos, las lectinas son de interés porque algunas de ellas se unen predominantemente a los linfocitos e inducen su mitosis. Otras lectinas inhiben la síntesis protéicas en células eucariontes y algunas son capaces de aglutinar a las células malignas más eficientemente que a las células normales <sup>(170)</sup>.

Las lectinas específicas frente a tumores son: concanavalina A, la aglutinina de *Ricinus communis* (RCA1), la aglutinina de la semilla de soja (SBA) y la de la semilla de frijol alado (*Psophocarpus tetragonolobus*) (WBA). Otras lectinas con potencial inmunostimulante que han despertado mucho interés, son una lectina específica galac-

tosídica aislada de una preparación de *Viscum album* comercializada bajo el nombre de Iscador® y una lectina específica, N-acetilglucosamina, obtenida de *Urtica dioica* <sup>(170)</sup>.

#### Alcaloides y otros compuestos nitrogenados

En este grupo han sido descritos como inmunomoduladores los siguientes compuestos: ácido aristolóquico, colchicina, demecolcina, vincristina, vinblastina, tiloforina, emetina y cefarantina <sup>(2, 3, 4, 171)</sup>.

Una planta interesante, rica en alcaloides, es la *Uncaria tomentosa* L. (*Rubiaceae*), (FIGURA 5), conocida popularmente en el continente americano como "uña de gato" o "garabato". Esta especie se confunde frecuentemente con la *Uncaria guianensis* <sup>(172)</sup>.

Se trata de una liana trepadora que puede alcanzar los 20 metros de altura. Los tallos primarios están provistos de espinas recurvadas en forma de ganchos firmes, de ahí su nombre común. Las hojas son opuestas, brevemente pecioladas y enteras. Posee inflorescencia en umbelas axilares, a veces terminales, pedunculadas, de color blanco cremoso o amarillento, flores sésiles o pedunculadas y fruto en cápsula. La planta crece en los bosques con abundante luz, a una altitud de 500 a 600 metros sobre el nivel del mar. Una amplia descripción de la especie ha sido efectuada por Anderson y Taylor <sup>(173)</sup>. La distribución de la *Uncaria tomentosa* abarca desde Belice y Guatemala hasta Perú, Venezuela, Trinidad y Surinam.

Las tribus de la amazonía peruana (Campa, Amuesha y Ashanica) atribuyen propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas y antiartríticas a la infusión y decocción de la corteza y raíz, así



FIGURA 4. *Viscum album*. Foto: Carlos E. Hermosilla.

como al líquido almacenado en los tejidos internos del tallo. En los últimos años el uso medicinal de la "uña de gato" se ha extendido a otras regiones y culturas, las cuales le han atribuido, además, actividad antitumoral e inmunomoduladora.

La "uña de gato" se ha propuesto en el Perú y otros países iberoamericanos para el tratamiento del cáncer. Keplinger presentó una solicitud de patente (WO 8201,130) que describe la eficacia de diferentes extractos de *Uncaria tomentosa* para el tratamiento de varias formas de tumores malignos. En el mercado existe un extracto hidrolizado de *Uncaria*, en forma de cápsula (Immun Act®) para inmunodeficiencias y enfermedades inflamatorias.

Wagner et al <sup>(174)</sup> aislaron seis alcaloides oxindólicos pentacíclicos que producen un aumento de la fagocitosis. Sin embargo, la actividad fue menor en los compuestos aislados que en los extractos. También se reportaron seis heterósidos del ácido quinóvico con actividad antiinflamatoria.

Algunos de los alcaloides oxindólicos de la raíz de *Uncaria tomentosa* tienen la capacidad de aumentar la actividad fagocítica de leucocitos PMN *in vitro* y estimulan la fagocitosis *in vivo*, medida por aclaramiento del carbón en ratones. Los extractos acuosos y alcohólicos de la raíz también muestran estos efectos. La fracción alcaloídica demostró actividad *in vitro* pero la mezcla purificada de alcaloides no fue activa *in vivo*. Sin embargo, al añadir una solución de catequina al 10% a dicha mezcla, se observó la actividad *in vivo*. Una vez más es importante considerar el fenómeno de la sinergia cuando se estudia la actividad biológica de los compuestos obtenidos de los productos naturales y los fitomedicamentos.

Entre los alcaloides oxindólicos de la *Uncaria tomentosa* ensayados por su actividad sobre la fagocitosis, el hidrocloreto de isopteropodina fue el más potente, mientras que pteropodina, isomitrafalina e isorincofilina demostraron una actividad débil y la mitrafalina y la rincofilina fueron inactivas.

En un reciente artículo, Klepinger et al <sup>(175)</sup> han reportado que los alcaloides oxindólicos pentacíclicos estimulan la producción del factor regulador de la proliferación linfocitaria en células endo-



FIGURA 5. *Uncaria tomentosa*. Foto: Salvador Cañigüeral.

teliales *in vitro*, mientras que los alcaloides oxindólicos tetracíclicos actúan como antagonistas. Se observó además una significativa normalización del porcentaje de linfocitos *in vivo* aunque el número total de leucocitos no sufrió cambios.

### Terpenoides

Lindequist y Teuscher <sup>(2)</sup> y Wagner y Proksch <sup>(3)</sup>, han revisado el tema de los terpenoides con actividad inmunomoduladora. Varios de ellos poseen actividad antiartrítica y/o antiflogística. Esto es especialmente cierto para lactonas sesquiterpénicas con estructura  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona en posición *cis* al anillo de ciclopentano. Sus actividades parecen estar mediadas por mecanismos inmunológicos. Entre otros terpenoides, la helenalina (*Arnica montana*), tenulina, 7-epufaisopina, zexbrevina A y B (*Zexmenia brevifolia*), alantolactona y 11,13-dihidrolantolactona de *Inula helenium*, dicetocorionina B de *Coriolus consor* y ovalicina de cultivos de *Pseudorotium ovalis*, modulan la respuesta inmune.

Dentro de la subclase de los diterpenos, los derivados de forbol, de *Euphorbia sp.*, son conocidos por poseer actividad inmunomoduladora. Por ejemplo, el acetato-miristato de forbol (PMA) es usado como inductor de procesos metabólicos de activación en estudios inmunológicos.

La witaferina A (un esteroide), demostró inhibir el rechazo de trasplante en pollos y suprimir la artritis en ratas. El alcaloide esteroide, solasodina, también parece poseer actividad inmunosupresora.

Recientemente, se han identificado otros terpenoides con actividad inmunomoduladora. La peo-

niflorina (*Paeonia alliflora*), peonona, esferantanólido (*Sphaeranthus indicus*), y glicowitanólidos, sitoindósido IX y sitoindósido X de *Withania somnifera* y cuatro componentes heterosídicos de *Randia dumitorum* son algunos ejemplos.

### Fenoles

Aparte de las características conformacionales específicas de compuestos fenólicos particulares que interfieren con los sitios inmunológicos, los compuestos fenólicos en general pueden actuar química y bioquímicamente con sistemas de transferencia de electrones o sistemas óxido-reductores. En términos de mecanismo de inmunomodulación los compuestos fenólicos pueden interactuar con sistemas que regulan y producen especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, los compuestos fenólicos de cierta configuración y tamaño molecular pueden unirse bioquímicamente con iones metálicos y formar complejos con sistemas enzimáticos. Aunque hay que ser consciente de las interacciones no específicas, la búsqueda de compuestos fenólicos inmunomoduladores se enfoca a su selectividad y especificidad de acción. La variabilidad y diversidad de constituyentes fenólicos de origen natural es de tal magnitud e impredecibilidad que su estudio es muy complejo.

La apocinina, molécula simple derivada del p-acetofenol, muestra una potente e interesante actividad inmunomoduladora <sup>(156, 157, 176, 177)</sup>. *In vitro*, la apocinina es un inhibidor potente de la liberación del anión ( $O_2^-$ ) superóxido de neutrófilos. *In vivo*, demostró una potente actividad antiartrítica.

Los ácidos vainílico y ferúlico, pierósido II, III, V, aunque menos potentes *in vitro* que la apocinina, demuestran una inhibición similar de producción de especies reactivas de oxígeno por leucocitos PMN activados. El peonol, isómero de apocinina aislado de *Paeonia moutan*, también inhibe la formación del tromboxano  $B_2$  y la agregación plaquetaria.

Otro compuesto fenólico que inhibe la quimioluminiscencia dependiente de luminol en leucocitos PMN estimulados por zymosan es el ácido gálico. El multifidol y el glucósido de multifidol, aislados del látex de *Jatropha multifolia*, también inhiben la producción de ROS por leucocitos PMN activados.



Dos heterósidos de fenetilalcohol (jionósidos A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>), aislados recientemente, de las raíces de *Rehmania glutinosa* var. *hueichingensis*, demostraron actividad inmunosupresora.

Los flavonoides, otro grupo de polifenoles naturales también exhiben propiedades inmunomoduladoras<sup>(5, 178, 179, 180)</sup>. La kadsurenona, aislada de *Piper futokadsura*, es un ejemplo de lignano inhibidor competitivo específico del PAF.

### Plantas con actividad inmunomoduladora

En el próximo número aparecerá la segunda parte del artículo en el que presentamos una relación de las especies de plantas con actividad inmunoestimulante e inmunosupresora respectivamente.

### Conclusión

Los productos naturales en general y las plantas superiores en particular proveen excelentes materias primas para el descubrimiento y desarrollo de compuestos inmunomoduladores novedosos. Además del descubrimiento de nuevas entidades moleculares activas, existe la posibilidad de identificar nuevos mecanismos de acción.

La región iberoamericana cuenta con una gran biodiversidad y una extensa y rica medicina tradicional y popular que puede ser la base para el descubrimiento de nuevos agentes inmunomoduladores novedosos para todo el mundo. Bajo esa premisa el subprograma de Química Fina Farmacéutica del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) ha diseñado un proyecto de investigación en este campo, el cual cuenta con un gran número de grupos de investigación que representan a la mayoría de los países de la región.

### Autores

Ceferino Sánchez  
Departamento de Farmacología  
Universidad de Panamá

Mahabir Gubta  
Ana Isabel Santana  
CIFLORPAN  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Panamá

### Dirección de contacto

Ceferino Sánchez  
Apartado 6281 · Panamá  
República de Panamá  
ceferino@ancon.up.ac.pa

### Referencias bibliográficas

*Nota de la editorial: Debido a la extensión de este apartado, ofrecemos excepcionalmente las citas bibliográficas de forma abreviada.*

1. Sirois P, Rola-Plesz Cuyzski M. En: Turk, JL (Ed). Research Monographs in Immunology. Amsterdam: Elsevier, 1982.
2. Lindequist U, Teusher E. Pharmazie 1985; 40: 1- 10.
3. Wagner H, Proksch A. En: Wagner H, et al (Eds). Economic and Medicinal Plant Research, Vol. 1, New York: Academic Press, 1985.
4. Wagner H, En: Hostettmann K, Lea PJ (Eds). Biologically active Natural Products. Oxford: Clarendon Press, 1987.
5. Labadie RP, et al. Planta Med 1989; 55: 339-352.
6. Wagner H. et al. En: Hostettmann K, et al (Eds) Phytochemistry of Plants used in Traditional Medicine. Oxford Science Publications, 1994.
7. Franz G. Pharm Pharmacol Lett 1995; 5: 154-158.
8. Franz G, Kraus J. En: Microbial Infections, Friedman, H. et al (Eds) New York: Plenum Press, 299-308, 1992. Adv. Exp. Med. Biol. 231- 307, 1997.
9. Hadden JW. TIPS 1993; 14 (5), 169-174.
10. Bomford R. Phytother Res 1988; 2 (4): 159-163.
11. Franz G. Anspruch und Wirklichkeit AJ 1997; 19 (1): 26-32.
12. Thatte UM, Dahanukar SA. Phytother Res 1989; 3 (2): 43-49.
13. Zhang LH et al. Phytother Res 1995; 9 (5): 315-322.
14. Bohlin L. En: Hostettmann K, Lea PJ (Eds). Biologically active Natural Products Oxford: Clarendon Press, 1987.
15. Wagner H. ZFA 1984; 59 (24): 1282-1289.
16. Wagner H. Internist (Berlin) 1988; 7:472-478.
17. Wagner H. Basel: Birkhauser Verlag, 1999.
18. Azuma J, Jollis G (Eds). Immunostimulants. Berlin: Springer Verlag, 1987.
19. McCall CA. Biotechnology 1989; 7:231-240.
20. Talmadge JE. Biotherapy 1990; 4: 215-236.
21. Yamada H. Biotechnology. 1991; 2: 203-210.
22. Lindequist U, Teusher E. Pharmazie 1988; 40: 10 .16.
23. Stolze A, Stammwitz U. Sozial Pädiatrie 1986; 8: 536-540.
24. Wozniowski T et al. Gazette Médicale 1992; 429-436.
25. Wagner H. Biologische Medizin 1984; 13: 3-11.
26. Kraus J, Roszkopf F. Pharm Pharmacol Lett 1991; 1: 11-14.
27. Wagner H, Jurcic K. En: Hostettmann K (Ed). Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity. Vol 6, London: Academic Press, 1991.
28. Beretz A, Cazenave JO. En: Hostettmann K (Ed). Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity. Vol 6. London: Academic Press, 1991.
29. Kiso Y, Hikino H. En: Hostettmann K (Ed). Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity. Vol 6. London: Academic Press, 1991.
30. Devlin JP et al. En: Wagner H et al (Eds). Economic and Medicinal Plants Research Vol 5, London: Academic Press, 1991.
31. Coligan JE et al. Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing - Wiley-Interscience, 1991.



32. Adams DO et al. *Methods for studying Mononuclear Phagocytes*, New York: Academic Press, 1981.
33. Higg GA, Williams TJ (Eds) *Inflammatory Mediators*, Deerfield Beach: VCH Publishers, 1985.
34. Wilkinson PC. *Chemotaxis and Inflammation*. 2nd Ed., Edinburgh: Churchill Livingstone, 1982.
35. Fantone JC, Ward PA. *Oxygen Derived Radicals and Their Metabolites: Relationship to Tissue Injury*. Current Concepts, Kalamazoo: Up John Co, 1985.
36. Fehér J et al. *Free Radical Reactions in Medicine*, Berlin: Springer Verlag, 1987.
37. Brandt I. *Scand J Haematol* 1967, Supl. 2.
38. Tympner KD et al. *Munch Med Wschr* 1978; 8, 251.
39. Wagner H et al. *Arzneimittelforsch*. 1983; 33, 1592.
40. Allen RC. En: De Luca MD, Mc Elroy WD (Eds): *Bioluminescence and chemoluminescence*, Vol. 3. New York: Academic Press, 1981.
41. D'Onofrio C, Lohmann-Mathes ML. *Immunobiology* 1984; 167, 414-430.
42. Webb LS et al. *Infect Immun* 1994; 1051.
43. Cheson BD et al. *J Clin Invest* 1976; 58, 789.
44. Ward PA. *Am J Pathol* 1979; 77, 520.
45. Chenoweth DE et al. *J Immunol Meth* 1979; 25, 337.
46. Snyderman R, Pike MC. *Ann Rev Immunol* 1984; 2, 257.
47. Biozzi G et al. *Br J Exp Pathol* 1953; 34, 441.
48. Wagner H et al. *Planta Med* 1986; 52, 184.
49. Gerecke D, Gross R. *Blut* 1975; 41, 43.
50. Dean JH et al. *Int J Cancer* 1977; 20, 359.
51. Nowel PL. *Cancer Res* 1960; 20, 462.
52. Farrant J et al. *J Immunol Meth* 1980; 33, 301.
53. Maurer HR. *Cell Tissue Kinet* 1981; 14, 111.
54. Wagner H et al. *Arzneimittelforsch* 1988; 38, 273.
55. Kung PC et al. *Science* 1979; 206, 347.
56. Feucht HE et al. *J Immunol Meth* 1980; 38, 43.
57. Wilhelm M et al. *J Immunol Meth* 1986; 90, 89.
58. Meerpohl HG et al. *Eur J Immunol* 1976; 2, 213.
59. Luettig B et al. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81, 669.
60. Pross HF et al. *J Clin Immunol* 1981; 1, 51.
61. Oldham RK et al. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58, 1061.
62. Cohen AM et al. *J Immunol* 1971; 107, 895.
63. Canty TG, Wunderlich JR. *J Natl Cancer Inst* 1970, 45, 761.
64. Hebermann RB, Callewaert DM. *Mechanism of Cytotoxicity by Cells*. New York: Academic Press, 1985.
65. Kabat EA, Mayer MM. En Thomas CC (Ed). *Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry*. 2ª, Springfield, USA, 1961.
66. Platts-Mills TAE, Ishizaka K. *J Immunol* 1974; 113, 348.
67. Yamada H et al. *Carbohydr Res* 1986; 156, 137.
68. Wagner H, Jordan E. *Phytochemistry* 1988; 27, 2511.
69. Ruff M, Gifford GE. *Infect Immun* 1981; 31, 380.
70. Decker T et al. *J Immunol* 1987; 139, 957.
71. Nakamura S et al. *J Exp Mod* 1989; 169, 677.
72. Roesler I et al. *Int J Immunopharmac* 1991; 13, 27.
73. Labadie R. En: Colgate SM, Molyneux R (Eds) *Bioactive Natural Products*. Boca Raton: CRC Press, 1993.
74. Labadie RP. *J Ethnopharmacology* 1986; 15:221.
75. Kayakiri H et al. *Chem Pharm Bull* 1991; 39 (11): 2807-2812.
76. Boyle PH et al. *Febs Lett* 1993; 334 (3): 309-312.
77. Patil AD et al. *J Org Chem* 1997; 62 (6):1814-1819.
78. Schwarz YA et al. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85 (3):578-582.
79. Vasudev S et al. *Patent-Ger Offen* 1985; 3,329,186.
80. Dong Z, Zhang Y. *Chung-Kuo I Hsueh K'o Hsueh Yuan Hsueh Pao* 1986; 8 (6):440-444.
81. Waring P et al. *Aust J Chem* 1987; 40 (5): 991-997.
82. Kino T et al. *J Antibiot* 1985; 38 (7): 936-940.
83. Seow WK et al. *Immunol Lett* 1986; 13 (1/2): 83-88.
84. Mori H et al. *Planta Med* 1994; 60 (5): 445-449.
85. Carroll AR et al. *Aust J Chem* 1993; 46 (4): 489-501.
86. Peterson PK et al. *Biochem Pharmacol* 1993; 46 (3):343-348.
87. Arora PK et al. *Cell Immunol* 1990; 126 (2):343-353.
88. Bryant HU et al. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245 (3): 913-920.
89. Ghosal S et al. *J Chem Res(S)* 1990 (10):334-335.
90. Singh VK et al. *Indian J Parasitol* 1983; 7 (2):225-228.
91. Tsukagoshi S et al. *Can Treat Rev* 1984; 11 (2):131-155.
92. Oomura S et al. *Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho* 1994; 06 279, 480.
93. Li J et al. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* 1992; 17(5):382-386.
94. Johnson RD et al. *Patent-Brit Pat Appl* 1984; -2,127,413.
95. Funabashi Y et al. *Takeda Kenkyusho* 1992; (51):73-89 (1992).
96. Kosasi S et al. *Phytochemistry* 1989; 28 (9):2439-2441.
97. Sasaki H et al. *Biotherapy (Dordrecht Neth)* 1997; 10 (2):139-143.
98. Matsumoto TS et al. *Phytother Res* 1996; 10 (7):585-588.
99. Suzuki M et al. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16 (5/6): 463-468.
100. Nemoto J et al. *Biol Pharm Bull* 1993; 16 (10):1046-1050.
101. Sergeev AV et al. *Byull Eksp Biol Med* 1985; 100 (12):741-743.
102. Ahn YK et al. *Yakhak Hoe Chi* 1992; 36 (5): 412-426.
103. Buyuklinskaya OV et al. *Eksp Klin Farmakol* 1993; 56 (1):49-51.
104. Kobayashi T et al. *Anticancer Drugs* 1996; 7 (2):195-198.
105. Imai S et al. *Anticancer Res* 1994; 14 (3A): 933-936.
106. Hamann MT et al. *Heterocycles* 1996; 42 (1): 325-331.
107. Pei RJ et al. *Chin Pharmacol Bull* 1993; 9 (1): 68-72.
108. Bruley-Rosset M et al. *Ann N Y Acad Sci* 1984; 100 (11): 242-250.
109. Natarajan K et al. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1996; 93 (17): 9090-9095.



110. Yamada H et al. Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho 1990; 02 101,095.
111. Tsuji et al. *J Antibiot* 1992; 45 (8):1295-1302.
112. Steenberg PA et al. *Photochem Photobiol* 1997; 65 (4): 763-744.
113. Gu JY et al. *Biosci Biotech Biochem* 1994; 58 (10):1855-1858.
114. Moon CK et al. *Korean J Toxicol* 1992; 8 (1):1-7.
115. Jayson GC et al. *Brit J Cancer* 1995; 72 (2):461-468.
116. Nonaka et al. *Biosci Biotech Biochem* 1997; 61 (5):836-839.
117. Kurabayashi M et al. Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho 1987; 62 19,526.
118. Mahon TM, O'Neill LAJ. *J Biol Chem* 1995; 270 (48):28557-28564.
119. Anon. *Nutr Rev* 1988; 46 (10):363-365.
120. Herring AC et al. *Biochem Pharmacol* 1998; 55 (7):1013-1023.
121. Shivers SC et al. *Life Sci* 1994; 54 (17):1281-1289.
122. Smirnov VV, Mishenkova EL. *Antibiot Khimioter* 1994; 39(9/10):49-53.
123. Delcourt M et al. *Cell Immunol* 1996; 158 (2):158-164.
124. Galelli A et al. *J Immunol* 1995; 154 (6):2600-2611.
125. Kosasi S et al. *Febs Lett* 198; 256 (1/2):91-96.
126. Kino K et al. *J Biol Chem* 1989; 264 (1):472-478.
127. Koehn F et al. *Patent-Pct Int Appl* 1992; -92 02,541.
128. Beuth J et al. *Arzneim-Forsch* 1993; 43 (1):166-169.
129. Li H et al. *Yaowu Shengwu Jishu* 1995; 2 (1):37-39.
130. Hsu HC et al. *Biochem J*. 1997; 323 (2):557-565.
131. Chopin V et al. *Eur J Biochem* 1998; 254 (3):565-570.
132. Lin P et al. *Chung Ts'ao Yao* 1985; 16 (2):66-69.
133. Zang Q et al. *Hejishu* 1984 (2): 55-57.
134. Baram NI, Ismailov AI. *Chem Nat Comp* 1993; 29 (3): 275-287.
135. Pestka JJ et al. *Toxicol Lett* 1990; 50 (1):75-84.
136. Miyamoto KI et al. *Cancer Immunol Immunother* 1988; 27 (1):59-62.
137. Hatano T et al. *Chem Pharm Bull* 1989; 37 (8): 2269-2271.
138. Frei B et al. *Planta Med* 1998; 64 (4):385-386.
139. Liu M, Zhang JT. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1995; 30 (11): 818-823.
140. Orita M. *Kinki Daigaku Igaku Zasshi* 1991; 16 (4): 581-593.
141. Bauer R, Wagner H. En: Wagner H, Farnsworth NR (Eds) *Economic and Medicinal Plants Research, Plants and traditional medicine*, Vol 5. London: Academic Press, 1991.
142. Srivastava R, Kulshreshtha D K. *Phytochemistry* 1989; 28, 2877.
143. Kraus J, Franz G. En: Friedman et al (Ed). *Microbial Infections*. New York: Plenum Press, 1992; 299-308.
144. Wagner H. *Pure and Appl Chem* 1990; 7: 1217-1222.
145. Franz G. *Blick in die Wissenschaft* 1993; 2: 24-30.
146. Bauer R, Wagner H. *Deutsche Apotheker Ztg* 1996; 136: 52-54.
147. Bauer R, Wagner H. *Echinaceae*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1990.
148. Parnham M J. *Phytomedicine* 1996; 3(1): 95-102.
149. Kiyohara H, Yamada H. *Carbohydr Res* 1989; 193, 173.
150. Proksch A, Wagner H. *Phytochemistry* 1987; 26, 1989.
151. Yamada H et al. *Planta Med* 1984; 48, 163.
152. Hart LA et al. *Planta Med* 1988; 23, 61.
153. Hart LA et al. *Planta Med* 1989; 55: 509.
154. Simmons JM et al. *Phytother Res* 1990; 4: 207.
155. Simmons JM et al. *J Ethnopharmacol* 1989; 26, 169.
156. Simmons JM. *Immunomodulation by Picrorhiza kurroa*, basis for its ethnomedical use. Ph.D thesis. University of Utrecht, 1989.
157. Müller EA et al. *Immunopharmacology* 1989; 17: 11.
158. Müller EA et al. *Immunopharmacology* 1990; 19: 69.
159. Klett CY, Anderer FA. *Arzneim-Forsch* 1989; 39 (11): 1580.
160. Sirois P, Rola-Pleszczyndki M. En: Turk JL (Ed). *Research monographs in Immunology Vol 4*, Amsterdam: Elsevier, 1982.
161. Werner GH et al. *Experientia* 1986; 42:521.
162. Floc'h F. En: Bloom SR, Burnstock G (Ed) London: IBC Technical Services, 1991.
163. Hayto T et al. *Cancer Res* 1989; 49: 4803.
164. Kosasi S. Ph D Thesis. University of Utrecht, 1990.
165. Kosasi S et al. En: Starsia Z, Nydegger U (Eds) *Complement, and Inflammation. Laboratory and clinical research*. Abst. 3rd. European Meeting on complement in Human Disease. S Kayer Basal, 1990; 7, 155.
166. Kosasi S et al. *FEBS Lett*. 1989; 256: 91.
167. Lis H, Sharon N. *Ann. Rev. Biochem.* 1973; 42, 541.
168. Samtleben R et al. En: Wagner H (Ed). *Immunomodulatory Agents from Plants (Progress in Inflammation Research)*. Basel: Birkhauser Verlag, 1999.
169. Wagner H. *Pure and Appl Chem* 1990; 7: 1217-1222.
170. Lock de Ugaz O, Callo NC. *Revista de Química* 1991; 5 (1), 47.
171. Anderson L, Taylor CM. En: Harling G, Anderson L (Ed) *Flora of Ecuador*. Copenhagen: Council for Nordic Publications in Botany, 1994; 50, 1-112.
172. Wagner H et al. *Planta Med* 1985; 5, 419.
173. Keplinger K et al. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999; 64, 23.
174. Simmons JM et al. *Free Red Biol. Med* 1991; (8): 251.
175. Hart BA et al. *Freed Read Biol. Med* 1990; (9): 127.
176. Kraus J, Franz G. En: Friedman et al. *Microbial Infections*. New York: Plenum Press. 1992; 299-308.
177. Wagner H et al. *Planta Med* 1985; 404.
178. Hart BA et al. *Chem Biol Inter* 1990; 73: 323.
179. Lasure A et al. *Phytomedicine* 1995; 1 (4): 303-307.
180. Iwama H et al. *J. Ethnopharmacol* 1986; 18 (2): 193-204.