

Efecto de anapsos (*Polypodium leucotomos*) sobre la producción in vitro de citocinas en células mononucleares de sangre periférica humana

I. Introducción

Anapsos (Calaguala; *Polypodium Leucotomos*) es un helecho típico de determinadas zonas de Centroamérica, siendo utilizados sus rizomas en el tratamiento de enfermedades cutáneas como el psoriasis y la dermatitis atópica. Sus efectos clínicos han sido confirmados y documentados en ensayos clínicos abiertos y doble-ciego controlados con un grupo placebo. El extracto es administrado oralmente a los pacientes, y hasta el momento sólo han sido observados efectos secundarios menores como gastralgias (1-3).

Los primeros estudios del producto demostraron un efecto antitumoral (4). Otros autores confirmaron su efecto antineoplásico, atribuyéndolo a una interacción con receptores citoplasmáticos similar a la ejercida por los glucocorticoides (5).

Estudios "in vivo" e "in vitro" en sujetos sanos demuestran que Anapsos posee, además, efectos inmunomoduladores. Así, la administración de Anapsos por vía oral aumenta el índice de supresión, la respuesta linfoblástica a mitógenos, los niveles séricos de inmunoglobulinas y la proporción de células T OKT 8+ (supresoras citotóxicas), de un modo tiempo-dependiente (6). Otros estudios refieren éste efecto inmunomodulador del producto en diferentes patologías (7,8).

Otros autores han comprobado que este compuesto actúa como potencial agente neurotrófico y neuroinmunoregulator, modulando la producción de IL-1b, IL-2 y TNF-a en el sistema nervioso central (SNC) de ratas y mejorando la coordinación psicomotora (9,10).

En un intento de ahondar en la actuación del producto desde un punto de vista inmunológico que nos permitiera hallar un nexo común capaz de justificar la mayor parte de sus efectos, decidimos testar la capacidad inmunomoduladora de dicha sustancia "in vitro".

II. Material y métodos

Preparación del extracto

Los rizomas del polipodium leucotomos fueron recolectados en las Plantaciones Experimentales y de Recuperación Ecológica de Guatemala, situada a 2000 metros de altitud (propiedad de ASAC Pharmaceutical International). Una vez examinados por la Universidad de San Carlos de Guatemala, los rizomas fueron deshidratados a 50° C durante 48 horas, sumergidos y macerados con disolventes polares durante 8 horas. El extracto obtenido, fue filtrado, liofilizado y cedido por ASAC para el presente trabajo.

Muestra del estudio

Las células mononucleares se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll Hypaque) de un grupo de donantes sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 21 y 35 años.

Condiciones de cultivo

Las células separadas fueron ajustadas a 1×10^6 /ml con medio de cultivo RPMI 1640 (WHITAKER), suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FLOW), 1% de antibiótico (GIBCO) y 1% de Glutamina (GIBCO).

Respuesta proliferativa frente a mitógenos

Las células se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos (NUNC) de fondo plano, a razón de 2×10^5 /pocillo (200 ul/pocillo) y estimuladas con 0,5 ug/ml de Fitohemaglutinina (PHA) o 4 ug/ml de Pokeweed (PWM), con y sin Anapsos (ANP), así como con Anapsos solo. Las dosis de Anapsos utilizadas en todos los casos fueron de 75, 150, 500, 1500 y 4500

ug/ml. Como control de la proliferación, se utilizaron células conteniendo sólo medio de cultivo. Las células se incubaron a continuación en estufa de cultivo, durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂; 18-20 horas antes de finalizar el cultivo, se incorporó al medio 1 uCi de 3[H]-Timidina (AMERSHAM). Finalmente las células fueron recolectadas en el Harvester y la proliferación, medida en un contador beta y expresada en c.p.m. .

Determinación de citoninas

Las células se sembraron a 1×10^6 /ml en placas (COSTAR) de 12 pocillos, a razón de 1 ml/pocillo. La estimulación se realizó con LPS (20 ug/ml) y/o PHA (4 ug/ml) y/o Anapsos (150 ug/ml). Se utilizó esta dosis de Anapsos porque resultó ser la dosis óptima. Las células se incubaron en estufa (37°C, 5% de CO₂) y se realizó una cinética completa de cada una de las citocinas (a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas), para cada una de las condiciones de estimulación. Tras centrifugar los medios, se recolectaron los sobrenadantes en viales de congelación (1 ml/vial) y se guardaron en congelador a -70°C, hasta su ulterior procesamiento. Las Citocinas medidas fueron la Interleuquina-1-Beta (IL-1b), Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-a), Interleuquina-2 (IL-2), Interferón-Gamma (INF-g), Interleuquina-4 (IL-4) e Interleuquina-10 (IL-10) y su determinación se realizó mediante ELISA (RD Diagnostics).

Estadística

En el análisis estadístico se emplearon los coeficientes de correlación lineal y la t-Student para datos pareados.

III. Resultados

Cuando las células se estimularon con Anapsos solo, se observó un aumento estadísticamente significativo en la proliferación, con las concentraciones de 75

($p=0.013$) y 150 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0.017$) vs. control (Figura 1); dichas concentraciones coinciden respectivamente con las dosis terapéuticas del producto. Dicho incremento quedó enmascarado cuando las células fueron simultáneamente estimuladas con los mitógenos PHA o PWM (datos no mostrados). La viabilidad celular fue buena en todos los casos ($>90\%$), salvo con la concentración más alta de Anapsos (4500 $\mu\text{g/ml}$).

Los niveles de IL-1b de células estimuladas con LPS+PHA, fueron siempre inferiores a los producidos por células estimuladas solo con LPS, aunque sólo a las 12 horas de cultivo las diferencias fueron estadísticamente significativas (798+67 pg/ml vs. 1041+98) ($p<0.05$). También se aprecia en estas primeras 12 horas, una reducción estadísticamente significativa en los niveles de IL-1b en el grupo de células estimuladas con LPS+ANP versus LPS ($p<0.025$). Del mismo modo, pudimos observar un retraso de 12 horas en la síntesis y/o liberación de IL-1b cuando las células fueron estimuladas con Anapsos, con un máximo de producción a las 24 horas de cultivo. Las células estimuladas sólo con LPS y/o LPS+PHA alcanzaron este máximo a las 12 horas (Figura 2.A).

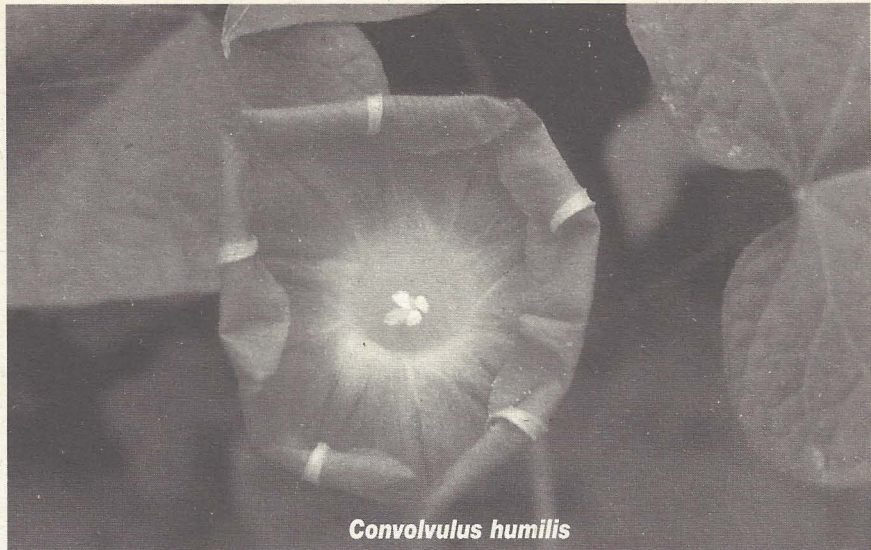
Cuando las células fueron estimuladas con LPS+PHA, la cinética de la curva de producción de IL-2 fue prácticamente idéntica a la obtenida con LPS solo. Sin embargo, la adición de Anapsos a LPS+PHA, produjo siempre un incremento significativo en los niveles de dicha citocina (Figura 2.B).

La estimulación con LPS+PHA se tradujo en un incremento significativo en los niveles de INF-g, si se comparaban con los obtenidos al estimular las células con LPS solo. Cuando a LPS+PHA también se añadió Anapsos, dichas diferencias aumentaron, alcanzando una mayor significación (Figura 2.C) a partir de las 24 horas de cultivo.

La estimulación con LPS+PHA produjo siempre un incremento significativo en los niveles de la IL-10 versus LPS solo. Tras añadir Anapsos a LPS y/o LPS+PHA, se produjo igualmente un incremento en los niveles de dicha citocina, que en el caso del LPS+PHA se tradujo a partir de las 24 horas de cultivo, en un nivel de significación mayor (vs. LPS) que el obtenido al añadir la PHA al LPS (Figura 2.D).

Los niveles obtenidos de IL-4 y TNF-a para las distintas condiciones de estimulación, fueron prácticamente idénticas, no existiendo en ningún caso diferencias significativas entre ellas (datos no mostrados)

Las principales correlaciones entre citoci-



Convolvulus humilis

nas para las distintas condiciones de estimulación, quedan reflejadas en la Tabla I.

IV- Discusión

Las citocinas son glicoproteínas generalmente secretadas por los leucocitos, que median respuestas del huésped frente a estímulos inflamatorios y/o infecciosos. Su papel en la respuesta inmunitaria se conoce desde hace tiempo (11). Así, citocinas como la IL-1b o el TNF-a, juegan un importante papel en la regulación de las funciones celulares (12), compartiendo multitud de efectos (13-15).

Se ha propuesto una subdivisión de los linfocitos T CD4+ de ratón, basada en diferencias en sus patrones de producción de citocinas. Hoy se acepta que los clones TH1, sintetizan y secretan entre otras citocinas IL-2 e INF-g, pero no IL-4 ni IL-5, mientras que los clones TH2 producen entre otras IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 pero no IL-2 ni INF-g; una tercera subpoblación de linfocitos T (TH0), sintetiza un patrón mixto de dichas citocinas (16). Diversos autores han aislado clones de linfocitos T humanos, similares a los TH0, TH1 y TH2 del ratón. Algunos de estos autores han comprobado además que dichos patrones pueden acumularse en los tejidos o en la sangre periférica de pacientes con distintas enfermedades. La subpoblación TH1 representa a las células efectoras más importantes en reacciones inflamatorias asociadas a respuestas de hipersensibilidad retardada, pero con baja producción de anticuerpos. El fenotipo funcional de la mayor parte de los clones TH2, se asocia a producción persistente de anticuerpos (incluyendo IgE) y eosinofilia (17,18). Numerosas enfermedades autoin-

munes se han asociado con producción excesiva "in vitro" de citocinas inflamatorias como la IL-1b y el TNF-a; y otras enfermedades como el SIDA o el lupus eritematoso sistémico, se han asociado con una producción disminuida de citocinas TH1-like como la IL-2 y el INF-g (19-22).

"In vitro", PBMCs de controles sanos estimuladas con ConA demostraron que dosis altas de Anapsos añadidas al cultivo, producían una supresión de la proliferación, una inhibición en la secreción de IL-2 y un incremento en la secreción de diversas monocinas, todo ello de forma dosis-dependiente (23).

Nosotros demostramos que Anapsos "in vitro" a dosis terapéuticas, es capaz de estimular la proliferación de PBMCs, de disminuir la secreción de IL-1b y, por el contrario, de aumentar la de IL-2. Estos resultados, en principio contradictorios con los del estudio previo, creemos pueden ser debidos básicamente a diferencias metodológicas. De hecho, cuando nosotros utilizamos dosis superiores también observamos una tendencia a la disminución en la proliferación, aunque en ningún caso llega a ser significativa (datos no mostrados). Por otro lado, el efecto incrementador sobre la proliferación se hizo evidente cuando las células fueron estimuladas sólo con Anapsos, quedando dicho efecto enmascarado por la coestimulación con otros mitógenos. La cinética de producción de citocinas del presente estudio, demuestra que la coestimulación con Anapsos retrasa la máxima secreción de IL-1b, respecto de la estimulación con mitógenos solos, lo que concuerda con estudios realizados "in vivo" con el producto (9,10).

El hecho de que Anapsos pueda ser capaz de bloquear la producción o la liberación de

citocinas inflamatorias como la IL-1b, puede resultar de interés para explicar los efectos observados empíricamente en pacientes con psoriasis (24). Se ha demostrado el papel que niveles aumentados de IL-1b y/o TNF-a, juegan en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas (25-27), así como el papel terapéutico de agentes antiinflamatorios no esteroideos en estas enfermedades (28). Del mismo modo, los efectos observados con Anapsos sobre la IL-1b pueden justificar la actividad colagenopoyética del producto (29,30), pues es sabido que citocinas como la IL-1a, la IL-1b y el TNF-a, juegan un papel importante en la destrucción del tejido conectivo, al estimular la PGE2 y la colagenasa (31).

La estimulación conjunta de PBMNc con LPS+PHA, reduce la producción de IL-1 si se compara con LPS solo, y aumenta la producción de INF-g si se compara con PHA sola (32). Anapsos es capaz de potenciar el efecto de estimulación de la PHA, sobre el INF-g y la IL-10. Los aumentos de INF-g e IL-10 apoyan respectivamente los resultados obtenidos in vivo de su actividad antivírica y estimulante de la respuesta humoral (6,33-35). Estos efectos se verían reforzados por su acción incrementadora de la IL-2.

Basándonos en los resultados de las distintas correlaciones del presente estudio, concluimos que Anapsos ejerce un efecto opuesto e independiente sobre la IL-1b y la IL-2, así como entre la IL-1b y el INF-g y la IL-1b e IL-10. Sin embargo ejerce un efecto similar sobre la IL-10 y el INF-g. Estos resultados indican un efecto pleiotrópico "in vitro" de Anapsos para las distintas citoquinas, que podría deberse a un modo de acción diferente sobre distintas poblaciones del Sistema Inmune. Por un lado, Anapsos estaría ejerciendo un efecto inhibitorio sobre los monocitos, principales células secretoras de IL-1b. Por otro, estaría estimulando a diversos clones de linfocitos T, probablemente TH0 (IL-2, INF-g, IL-10), para que produjeran y/o secretaran sus citoquinas (datos en preparación).

Bibliografía

- 1.- Jiménez, D., Naranjo, R., Doblre, E., Muñoz, C., Vargas, J.F. "Anapsos an antipsoriatic drug, in atopic dermatitis". Allergol Immunopathol 1987, 15: 185-189.
- 2.- Piñero Alvarez, B. "Dos años de experiencia personal en el tratamiento con anapsos del psoriasis, en diferentes formas clínicas (495 casos)". Antolog. Dermatog. 1982, 11: 45-51.
- 3.- Beltrán, R., Martínez, B.P., Ruiz Jiménez, F.J. "Comunicación sobre un nuevo tratamiento efectuado con 130 niños afectados de dermatitis atópica". XI International Congress of Allergology and Clinical Immunology. London October, 1982.
- 4.- Horvath, A., Alvarado, F., Szöcs, J., De Alvarado, Z.N., Padilla, G. "Metabolic effects of Calagualine, an antitumor saponine of Polypodium leucotomos". Nature 1967, 214: 1256-1258.
- 5.- Vargas, J., García, E., Gutiérrez, F., Osorio, C. "Síntesis de ácidos nucleicos y niveles de AMP cíclico en tumores murinos después del tratamiento in vitro con anapsos". Arch Fac Med Madrid 1981, 40: 39-46.
- 6.- Vargas, J., Muñoz, C., Osorio, C., García-Olivares, E. "Anapsos, an antipsoriatic drug which increases the proportion of suppressor cells in human peripheral blood". Ann Immunol (Inst Pasteur) 1983, 134 C.: 393-400.
- 7.- Mohammad, A. "Vitiligo Repigmentation with Anapsos, Polypodium Leucotomos". Int J Dermatol 1989, 28:479.
- 8.- Carreño, MM., De Castro, P.: Fenotipo Inmunológico y tratamiento con Polypodium Leucotomos en pacientes con Esclerosis Múltiple. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología. Barcelona, 7-10 de Septiembre de 1994.
- 9.- Alvarez, X.A., Franco-Maside, A., Fernández-Novoa, L., Cacabelos, R. "Effect of Anapsos on behaviour and brain cytokines in rats". Ann Psych 1993, 3: 329-341.
- 10.- Alvarez, X.A., Zas, R., Lagares, R., Franco, A., Maneiro, E., Miguel-Hidalgo, J.J., Fernández-Novoa, L., Diaz, J. Cacabelos, R.: "Neuroimmunomodulatory and neurotrophic activity of anapsos: studies with laboratory animals". Annals of Psychiatry 1995, 5: 267-280.
- 11.- Dinarello, Ca., Mier, J.W.: "Lymphokines". N Engl J Med. 1987, 317: 940-945.
- 12.- Whicher, J.T., Evans, S.W.: "Cytokines in disease". Clin Chem 1990, 36: 1269-81.
- 13.- Old, L.J.: "Tumor Necrosis Factor". Science 1985, 230: 630.
- 14.- Dinarello, CA., Cannon, J.G., Wolf, S.M., Bernheim, H.A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I.S., Palladine, M.A., O'Connor, J.V.: "Tumor Necrosis Factor is an endogenous pyrogen and induces production of Interleukin 1". J Exp Med 1986, 163: 1433.
- 15.- Le, J., Vilcek, J.: "Cytokines with multiple overlapping biological activities". Lab Invest 1987, 56: 234.
- 16.- Mossman, TR., Cherwinsky, H., Bond, MW et al. J Immunol 1986, 136: 2348-2357.
- 17.- Romagnani, S.: "Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more". Immunol Today 1991, Vol.12 N°8: 256-57. Romagnani.
- 18.- Sewell, WA.: "T cell subsets". 2nd International Congress on Cytokines: Basic Principles and Clinical Applications. Florence, 23-25 March 1992: 38-9.
- 19.- Elmslie, RE., Dow, SW., Ogilvie, GK.: "Interleukins: biological properties and therapeutic potential". J Vet Intern Med 1991, 5(5): 283-93.
- 20.- Fong, Ky., Boey, ML., Koh, WH., Feng, PG.: "Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients". Clin Exp Rheumatol 1994, 12(1): 55-8.
- 21.- Larricki, JW., Wright, SC.: "Cytokine Modulation of Viral Infections". In: Kunkel SL, Remick DG, ed. Cytokines in health and disease. New York: Marcel Dekker Inc, 1992: 181-95.
- 22.- Dinarello, CA.: "Interleukin-1 in disease". Keio J Med 1994, 43(3): 131-6.
- 23.- Bernd, A., Ramirez-Bosca, A., Huber, H., Diaz Alperi, J., Thaci, D., Sewell, A., Quintanilla, E., Holzmann, H. "Immunomodulating effects of polypodium leucotomos extract on human leucocytes in vitro". Drug Research 1995, 45(2) n°8: 901-904.
- 24.- Vasange-Tuominen, M., Perera-Ivarsson, P., Shen, J., Bohlin, L., Rolfsen, W.: "The fern Polypodium Decumanum, used in the treatment of psoriasis, and its fatty acid constituents as inhibitors of leukotriene B4 formation". Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (SCOTLAND)1994, 50(5): 279-284.
- 25.- Cacabelos, R., Barquero, M., García, P., Alvarez, XA, Varela de Seijas, E.: "Cerebrospinal Fluid Interleukin-1b in Alzheimer disease and Neurological Disorders". Meth Find Exp Clin Pharmacol 1991, 13(7): 455-458.
- 26.- Cacabelos, R.: "New strategies for Alzheimer's disease treatment: pleiotropic drugs and multifactorial intervention". In Alzheimer's Disease: Therapeutic Strategies, ed by E. Giacobini and R. Becker, Birkhäuser Boston, 1994: 493-498.
- 27.- Chofflon, M., Juillard, C., Juillard, P., Gauthier, G., Grau, GE.: "Tumor necrosis factor alpha production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis". Eur Cytokine Netw 1992, 3(6): 523-531.
- 28.- Mc Geer, PL., Rogers, J.: "Antiinflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease". Neurology 1992, 42: 447-9.
- 29.- Horvath, A., Tabora, E.: "Alterations of collagen in psoriatic skin". Dermatologica 1972, 144: 83-91.
- 30.- Perez de las Casas, O., Rodriguez, R., Gonzalez, AP et al: "Aloinjertos cutáneos tras la administración de extractos de Polypodium Leucotomos (Estudio Experimental). Quirúrgica 6, 1987, vol.30: 303-311.
- 31.- Hauptmann, B., Van-Damme, J., Dayer, JM.: "Modulation of IL-1 inflammatory and immunomodulatory properties by IL-6". Eur Cytokine Netw 1991, 2(1): 39-46.
- 32.- De Groote, D. et al.: "Direct Stimulation of Cytokines (IL-1B, TNF-a, IL-6, IL-2, INF-Gamma and GM-CSF) in Whole Blood. I. Comparison with Isolated PBMNc Stimulation". Cytokine 1992, 4(3): 239-248.
- 33.- San Martín, JC.: "Apuntes para un nuevo tratamiento sobre el herpes zoster". Antol. Dermatol. 1986, año XVI, 1: 24-26.
- 34.- Casas Tineo, M., Alonso, G., Casas Marín, M.: "Observaciones al tratamiento del herpes zoster, con anapsos como única medicación". Antol. Dermatol. 1988, 10: 24-27.
- 35.- Howard, M., O'Garra, A., Ishida, H., De Waal Malefyt, R., De Vries, J.: "Biological properties of Interleukin-10". J Clin Immunol 1992, 12(4): 239-247.