

Inhibición *in vitro* de la desgranulación de basófilos por drogas utilizadas habitualmente en el tratamiento del asma. Comparación con productos vegetales inmunomoduladores

In vitro basophils degranulation inhibition by drugs habitually used in the asthma treatment. Comparison with immunomodulator vegetal products

Ana María Maldonado¹, Laura N. Cariddi², Flavia Alaniz³, Julio Zigadlo⁴, Margarita Grosso⁵, Liliana I. Sabini⁶

1. Médica Especialista en Alergia e Inmunología, Prof. Asoc. Inmunología, UNRC, Dpto. de Microbiología e Inmunología. 2. Microbióloga, Becaria CONICET, Tesista Posgrado, Inmunología, Dpto. de Microbiología e Inmunología UNRC. 3. Microbióloga, Becaria Dpto. de Microbiología e Inmunología UNRC, Secretaría de Extensión UNRC. 4. Químico, Prof. Tit. F.C.E.F. y N. de la U.N.C., Instituto Modelo de Biología Vegetal (IMBIV); Investigador Científico del CONICET, Ciudad Universitaria, Córdoba. 5. Bióloga, JTP Botánica Sistemática, Dpto. de Ciencias Naturales, UNRC. 6. Microbióloga, Prof. Asoc. Virología, Dpto. de Microbiología e Inmunología, UNRC.

Autor para correspondencia: Ana María Maldonado

Dirección: Alsina 727. CP 5800. Río Cuarto. Provincia de Córdoba. Argentina

Teléfono (con prefijo internacional): TE: 0358-4622801, FAX: 0358-4676231

Conflicto de intereses: Apoyo recibido, subsidios de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNRC, Res. Rec. 296B/2005 Cod. C18/116

ARCHIVOS DE ALERGINIA E INMUNOLOGIA CLINICA 2007;38(2):00-00

Resumen

Antecedentes. Los derivados de *Achyrocline satureioides* (*A.s.*) y *Minthostachys verticillata* (*M.v.*) han sido utilizados tradicionalmente por sus propiedades antiinflamatorias y broncodilatadoras en el asma.

Objetivos. Comparar la inhibición de la desgranulación de basófilos *in vitro* por dexametasona, teofilina, cromoglicato disódico, bromuro de ipratropio + salbutamol con la de decocciones de hojas/flores de *A.s.* y decocción/aceite esencial de *M.v.*, mediante el dosaje de β -hexosaminidasa, un marcador de la reacción alérgica inmediata. Evaluar los efectos inmunomoduladores de la decocción/aceite esencial de *M.v.* sobre la producción de IFN- γ .

Metodología. Se estudiaron 38 pacientes alérgicos a hongos anemófilos. Se realizó prick y dosaje de IgE total por EIA. La liberación de β -hexosaminidasa se evaluó con el alérgeno solo y el alérgeno adicionado de las drogas comerciales o cada derivado vegetal, por EIA. Los niveles de IFN- γ fueron cuantificados por EIA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con decocción o aceite esencial de *M.v.*

Resultados. Todos los pacientes mostraron reactividad cutánea. Los basófilos desafiados *in vitro* por el alérgeno, liberaron β -hexosaminidasa. La liberación de la enzima fue disminuida por cada droga o derivado vegetal ($p < 0,05$). La producción de IFN- γ fue significativamente menor en los alérgicos que en los controles ($p < 0,02$). La decocción o el aceite esencial de *M.v.* estimularon la síntesis de IFN- γ en las muestras de paciente alérgicos ($p < 0,02$).

Conclusiones. La prueba de liberación de β -hexosaminidasa demostró ser una técnica accesible y de fácil realización que podría reemplazar o complementar las prácticas diagnósticas habituales. Bromuro de ipratropio + salbutamol resultó la droga más eficaz *in vitro*. Las decocciones de flores de *A.s.* y de hojas de *M.v.* mostraron potencia reguladora sobre la desgranulación *in vitro*. Decocción de hojas y aceite esencial de *M.v.*, fueron inmunomoduladores para la producción de IFN- γ .

Palabras claves: *Achyroclines satureioides*, *Minthostachys verticillata*, dexametasona, teofilina, cromoglicato disódico, bromuro de ipratropio, salbutamol.

Abstract

Background. Derivatives products of *A. satureioides* (*A.s.*) and *Minthostachys verticillata* (*M.v.*), have been used traditionally by their anti-inflammatory and bronchodilator properties in asthma treatment.

Objectives. To compare *in vitro* basophiles degranulation by dexamethasone, theophyllin, disodium cromoglicate, ipratropio bromide plus salbutamol, *A. satureioides* (*A.s.*) leaves or flowers decoction and *Minthostachys verticillata* (*M.v.*) leaves decoction or essential oil. To evaluate the immunomodulator effects of the *M.v.* decoction or essential oil on IFN- γ production.

Methods. 38 allergic patients to anemophilous fungi were studied. Prick test was made and levels of IgE by the EIA technique were obtained. β -hexosaminidase levels released were evaluated with allergens alone or added with commercial drugs or each one of vegetal derivative. The IFN- γ levels were quantified by EIA in supernatants of lymphocytes culture after *M.v.* decoction or essential oil stimulation.

Results. All patients were at least positive to one allergen. In all cases the allergen triggered basophils degranulation and caused the release to the enzyme β -hexosaminidase. β -hexosaminidase released by allergen was decreased by each one drug or vegetal derivatives. ($p < 0.05$). The

IFN- γ production was significantly smaller in the allergic patients than controls ($p < 0.02$). The decoction as the essential oil of *M.v.* stimulated synthesis of IFN- γ in allergic sample patients ($p < 0.02$).

Conclusions. The test of β -hexosaminidase release to identify the specific allergen demonstrated to be accessible technique and have easy accomplishment and could replace or complement habitual diagnosis practices. Ipratropio bromide + salbutamol was the drug combination with better *in vitro* answer. The *A.s* flowers decoction and *M.v.* leaves decoction showed strong regulator effects on *in vitro* basophils degranulation. *M.v.* leaves decoction and essential oil, showed immunomodulator effects on IFN- γ production.

Key words: *Achyrocline satureioides*, *Minthostachys verticillata*, dexamethasone, theophyllin, disodium cromoglicate, ipratropio bromide, salbutamol.

Introducción

Reacciones alérgicas

En las enfermedades alérgicas cobran relevancia las reacciones de tipo I o anafilaxias, las cuales son mediadas por anticuerpos citotrópicos como la inmunoglobulina E (IgE), que se une a receptores presentes en la superficie de mastocitos y basófilos. En una posterior entrada del antígeno, la IgE interacciona con él y pone en marcha los mecanismos que llevan a la liberación de los mediadores químicos, responsables de las manifestaciones de hipersensibilidad.

La IgE unida a los receptores de superficie de mastocitos y basófilos induce la activación de fosfolipasa C (PLC) que cliva a inositol trifosfato (IP3) en inositol bifosfato (IP2) y diacilglicerol (DAG). También se moviliza el calcio intracelular y se activa la cascada de proteínas cinasas C (PKC). Esta cascada estimula procesos que llevan a la desgranulación.

Los mediadores químicos que se liberan durante el proceso de desgranulación, constituyen dos grupos: los "preformados" y los "sintetizados durante el proceso". Dentro del primer grupo encontramos a: histamina, serotonina, heparina, factores quimiotácticos de eosinófilos y neutrófilos, enzimas como triptasas, quimasas, carboxipeptidasas, hidrolasas ácidas como β -hexosaminidasa y enzimas oxidativas.

En el segundo grupo podemos encontrar a los derivados del ácido araquidónico (leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos), bradiquinina, calidinas, factor de agregación plaquetaria y citoquinas [1].

Actualmente, la β -hexosaminidasa está siendo utilizada en los trabajos de investigación como marcador inmediato de la desgranulación de mastocitos y basófilos *in vitro*, en las reacciones de tipo anafiláctico [2-5].

Los LTCD8+ y CD4+ son las principales células efectoras de la respuesta inmune. Los LTCD4+ se diferencian, según el patrón de citoquinas que secretan, en: linfocitos Th1 y Th2. El IFN- γ es la citoquina clave de las células Th1, las cuales también producen IL-2 y TNF- β , que son las principales citoquinas activadoras de los macrófagos y de los linfocitos citotóxicos, es decir que son las efectoras de la inmunidad mediada por células. Entre las citoquinas de perfil Th1, el IFN- γ tiene una importante función regulatoria ya que aumenta la función Th1 e inhibe la diferenciación de linfocitos Th0 hacia el perfil Th2 así como la proliferación de clones Th2 pre-sensibilizados, en los que, además, limita la producción de IL-4.

Además IFN- γ tiene actividad antiviral, favorece el *switch* isotípico a IgG, tiene efectos antiproliferativos sobre células, participa en la activación de los macrófagos y en la activación de la función citotóxica de LTCD8 (+) [6,7].

En los pacientes alérgicos los niveles de IFN- γ se encuentran reducidos, hay un predominio de LTh2. Los altos niveles de IL-4 reducen la población de LTh1 y por lo tanto la producción de IFN- γ . La evolución favorable de la enfermedad alérgica se determina por el aumento en los niveles de IFN- γ y la disminución de los valores de IL-4, IgE y sCD23 [8,9].

Algunas drogas de uso habitual en el tratamiento del asma

Los medicamentos que se utilizan bloquean los mecanismos que llevan a la desgranulación en distintos niveles. En el tratamiento del asma se destacan: a) los que actúan en la fase inmediata, cuyo efecto es la broncodilatación con acción relajante sobre el músculo liso, donde se encuentran los β 2-agonistas, b) los que actúan en la fase inflamatoria tardía de la crisis, tales como antiinflamatorios esteroideos [10,11].

Las drogas empleadas más frecuentemente en nuestro medio han sido: dexametasona, teofilina, bromuro de ipratropio, salbutamol y cromoglicato disódico, entre otras.

Dexametasona

Los corticoides, además de los antihistamínicos, representan una de las terapias antiinflamatorias más efectivas en alergia debido a que bloquean distintas vías de desgranulación, activadas en este tipo de patología [12]. Dexametasona es un glucocorticoide sintético aplicado en el tratamiento de los desórdenes inflamatorios. Los glucocorticoides, además de ser antiinflamatorios, son drogas inmunosupresoras que promueven los depósitos anormales de lípidos y llevan a la obesidad, efecto indeseable para los pacientes alérgicos. Además, existe un número considerable de pacientes alérgicos que no responden al tratamiento con estas drogas. La resistencia a los efectos terapéuticos de los corticoides se ha visto además en otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoidea [13].

Los glucocorticoides son agentes β -adrenérgicos que se unen a receptores de membrana para ingresar al citoplasma y activar al ATP para formar AMPc. El AMPc inhibe el proceso de desgranulación de basófilos y mastocitos. Una vez en el citoplasma, los corticoides se unen a un receptor de corticoides (RC); éste se encuentra unido a una proteína hsp90. La unión corti-

coide-RC libera la proteína hsp90 y el complejo ingresa al núcleo donde se une al ADN en un gen específico de secuencia reguladora. Incorporado al ADN, modula la transcripción de una amplia variedad de genes [1].

Una de las formas en que los corticoides suprimen la inflamación es por el incremento en la síntesis de proteínas proinflamatorias. Entre ellas se pueden citar a lipocortina-1, la cual ejerce un efecto inhibitorio sobre la fosfolipasa A2 (PLA2) y por lo tanto puede inhibir la producción de mediadores lipídicos. Otras proteínas potencialmente antiinflamatorias son: el receptor antagonista de IL-1, el cual inhibe la unión de IL-1 (una citoquina proinflamatoria) a su receptor, SLPI (*secretory leukoprotease inhibitor*) un inhibidor de proteasas como la tripsina, entre otras [14].

Los corticoides también ejercen un efecto inhibitorio en la síntesis de citoquinas. Esto es muy importante en el control de la alergia, debido a que las citoquinas juegan un rol crítico durante el proceso inflamatorio. Estas drogas pueden inhibir la transcripción de: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-17, IL-18, TNF- α y GM-CSF. También ejercen efectos inhibitorios sobre quimioquinas: IL-8, RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3, MCP-4 y eotaxina. El efecto inhibitorio causado por los corticoides puede deberse, en parte, a la inhibición de los factores de transcripción tales como AP-1 y NF- κ B, los cuales regulan la inducción de los genes de citoquinas y quimioquinas [15].

Los corticoides también tienen una acción inhibitoria directa sobre basófilos y mastocitos y células del epitelio y/o endotelio vascular, efectoras de los procesos alérgicos. Los esteroides β -adrenérgicos son capaces de reducir la síntesis de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias de macrófagos, mientras que incrementan la secreción de IL-10 [16].

También tienen efecto sobre los eosinófilos, inhibiendo la liberación de especies reactivas del oxígeno y proteínas liberadas por estas células. Además, los corticoides son capaces de inducir apoptosis en los eosinófilos [17].

Es sabido que los mastocitos y los linfocitos Th2 juegan un importante rol en las enfermedades alérgicas debido a que liberan una serie de proteínas proinflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-6, entre otras. Los corticoides también pueden inducir apoptosis en células T y además se ha demostrado que el tratamiento prolongado con ellos reduce el número de mastocitos en las mucosas [18].

Algunos pacientes alérgicos no responden al tratamiento con corticoides. Se conocen varias causas por las cuales se crea la resistencia a los corticoides. Por un lado, ciertas citoquinas como IL-2, IL-4 e IL-13 pueden inducir una reducción en la afinidad de los receptores de corticoides (RC), en células inflamatorias como las células T, y esto genera una resistencia local a la acción antiinflamatoria de los corticoides [19]. Otra de las causas podría ser una excesiva activación del factor de transcripción AP-1, el cual activa la síntesis de citoquinas inflamatorias [20].

Otro mecanismo propuesto como resistencia a los efectos de los corticoides sería un incremento en la expresión del recep-

tor de corticoide- β (RC- β). EL RC- β es una variante del RC que no es capaz de unir corticoides pero sí es capaz de unirse al ADN como los RC. Un aumento de los RC- β , bloquearía la unión de los RC al ADN de las células blanco [21].

Teofilina

Teofilina es un antihistamínico de primera generación; es una xantina que actúa como inhibidor de la enzima fosfodiesterasa. La fosfodiesterasa inactiva al AMPc transformándolo en AMPci, el cual favorece la desgranulación de basófilos y mastocitos. Teofilina incrementa los niveles de AMPc inhibiendo el proceso de desgranulación. Esta droga es utilizada a menudo en el tratamiento del asma bronquial [22-25].

Cromoglicato disódico

El cromoglicato es un estabilizador de las membranas de los mastocitos que impide su desgranulación, actúa como quelato al fijar el Ca⁺⁺ e impide que éste se movilice a través de las membranas. Reduce el número de eosinófilos circulantes, inhibe la producción de IL-5 y TNF- β (Hall SE y cols., 1999; Lipworth BJ, 2005). Tiene efectos sobre la activación y migración celular al controlar algunas moléculas de adhesión como CD23, CD49 e ICAM-1 [26].

Cromoglicato también tiene efecto broncodilatador en el asma por ejercicio, donde predomina el broncoespasmo, y su efectividad oscila entre 70 y 87% [27]. También bloquea la broncoconstricción inducida por estimulación de las fibras C, mediadas por el vago y neuropéptidos, pero además inhibe las citoquinas producidas por los macrófagos y células dendríticas frente al *Dermatophagoides faringe* [28,29].

Estudios comparativos han demostrado su eficacia unido a un β -2 [30]. Ha sido tan efectivo como el nedocromil, los antagonistas de los receptores de leucotrienos (zafirlukast y montelukast) y los esteroides [14,31,32]. Es un fármaco seguro con escasos efectos adversos, que se relacionan con la acción irritante local. Su efectividad depende de altas concentraciones plasmáticas y para alcanzarlas debe utilizarse nebulizado [33]. El cromoglicato disódico es un fármaco útil como antiinflamatorio en el tratamiento del asma aguda, ya que tiene poder broncodilatador, antiinflamatorio y, como preventivo, evita la progresión de la crisis al estabilizar las membranas de los mastocitos [34].

Bromuro de ipratropio y salbutamol

Bromuro de ipratropio es un derivado de amonio cuaternario de atropina, una droga de acción anticolinérgica utilizada en las crisis de asma en lactantes y niños. Tiene efectos broncodilatadores similares a otros anticolinérgicos y β -2 agonistas [35].

Bromuro de ipratropio mostró buena actividad protectora del broncoespasmo inducido por metacolina y la recuperación más precoz del FEV1 [36]. Resultó de fácil aplicación, seguro y efectivo en niños alérgicos de 2 a 6 años [37].

Salbutamol, usado como sulfato de salbutamol, produce broncodilatación a través de la estimulación de receptores β -2

adrenérgicos del músculo liso bronquial y, de este modo, causa relajación de las fibras musculares lisas. Esta acción mejora la función pulmonar demostrada por mediciones de espirometría. A dosis terapéuticas tiene una pequeña acción sobre receptores β -2 adrenérgicos del músculo cardíaco. En algunos pacientes, salbutamol inhalado puede producir efectos cardiovasculares significativos, en frecuencia del pulso, presión sanguínea y cambios en el ECG además de temblores e hipokalemia. A los 5-15 minutos disminuye la resistencia de la vía aérea e incrementa el FEV-1 un 15%, alcanza el pico a los 60-90 minutos y los efectos duran de 3 a 6 horas. Se ha comprobado que la asociación de salbutamol en dosis de 0,10 mg/k y bromuro de ipratropio tiene los mismos efectos broncodilatadores que salbutamol solo, en dosis de 0,15 mg. La combinación de ambas drogas, administrada por inhalación, resultó más efectiva pues alcanzó el pico de respuesta a las 1-2 horas y prolongó la duración de los efectos más de 8 horas. Además, cada droga no potenció la absorción sistémica de la otra, y se logró una respuesta mejor a una dosis menor de salbutamol (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_Abstract&term=%22Anthracopoulos+MB%22%5BAuthor%5D) [38].

Cuando los pacientes no son capaces de responder a la terapia con corticoides y/o β -2 agonistas, se aplican otros tratamientos como inmunoterapia con alérgenos, y otros menos convencionales como la administración de IL-2, IFN- β o tratamiento con hierbas medicinales [39].

Medicina alternativa

La medicina alternativa y la medicina complementaria son formas de tratamiento generalmente demandadas por pacientes con enfermedades alérgicas. Estudios recientes demuestran que la homeopatía, la acupuntura y la medicina herbaria son los tipos más comúnmente utilizados de medicina alternativa [40].

Existen muchos trabajos de investigación que utilizan hierbas medicinales, o compuestos purificados de éstas, para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Entre numerosos trabajos de investigación, se destacan los hallazgos de Xue C y cols., 2004, quienes demostraron que una fórmula herbaria china que contiene una mezcla de seis hierbas medicinales tiene la capacidad de inhibir la liberación de histamina de mastocitos, inhibe la inflamación inducida por agentes químicos y produce una modulación sobre los niveles séricos de IgE y sobre la actividad de macrófagos y linfocitos. Esta fórmula es normalmente utilizada para el tratamiento de rinitis alérgica en China [41].

Achyrocline satureioides (LAM.) DC

Achyrocline satureioides (LAM.) DC es un subarbusto aromático, comúnmente conocido con el nombre de “marcela hembra”, “marcela” o “marcelita” [42-44]. Es originario de América y está distribuido en Europa y África. En Argentina, se la encuentra en suelos húmedos y arenosos [44] (Figura 1).

A. satureioides (*A.s.*) es utilizada en infusiones como digestivo, sedativo, antiinflamatorio, antiespasmódico, analgésico, diurético

y broncodilatador [45]. Esta última propiedad explica por qué esta especie es recomendada en medicina popular para el tratamiento de las crisis de asma [46,47].

También se ha demostrado que diferentes fracciones de *A.s.* poseen actividad antimicrobiana [48], antiviral [49], inhibidora de los niveles elevados de glucosa en sangre [50], protector hepático [51] y antioxidante [52,53].

Minthostachys verticillata (Griseb) Epling.

El género *Minthostachys* es un género taxonómicamente complejo. Comprende 12 especies de hierbas aromáticas y arbustos verdes que pertenecen a la familia Labiatae. Se encuentran distribuidas en Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Noroeste y centro de Argentina [54].

Entre las especies que componen el género se encuentran: *M. glabrescens* Epling.; *M. mollis* (Griseb.); *M. verticillata* (Griseb.) Epling.; *M. andina* (Brett.) y *M. spicata* (Benth.) Epling. La hierba aromática más popular, por su distribución y sus propiedades benéficas es *M. verticillata* (Griseb.) Epling vulgarmente conocida como peperina, pipirina, peperita o piperita (55, 56) (Figura 2).

M. verticillata (*M.v.*) se utiliza principalmente en infusiones como digestivo, estomacal, sedativo, antiespasmódico, anti-diarréico, antiemético, carminativo, broncodilatador, anti-reumático, insecticida, antimicótico y antiparasitario. También se emplea para aromatizar y fabricar licores, bebidas refrescantes y yerbas compuestas [54,57-59].

M.v. está registrada en la Farmacopea Nacional Argentina y es una planta en peligro de extinción por su extracción constante e indiscriminada [54,60,61].

Un estudio realizado en la Cátedra de Virología de la UNRC demostró que el extracto etanólico de *M.v.* posee efectos inhibitorios sobre la actividad citocidal del virus herpes suis [49].

Además, el aceite esencial y la decocción de *M.v.* han demostrado tener actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram (+) y propiedades antivirales sobre el virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) y el virus de la pseudorrabia (VPR) cepa RC/79 [62].

Por otra parte, también se demostró en estudios citomorfológicos, que la decocción y el aceite esencial de *M.v.* presentan índices de expansión celular similares al mitógeno Pokeweed [63].

Los antecedentes bibliográficos mencionados justifican nuestro interés por estudiar los efectos antialérgicos *in vitro* de las especies medicinales: *A.s.* y *M.v.*

Objetivos

Comparar los índices de inhibición de la desgranulación de basófilos *in vitro*, producidos por las decocciones de hojas/flores de *A.s.* y la decocción/aceite esencial de *M.v.* con los de dexametasona, teofilina, cromoglicato disódico y bromuro de ipratropio + salbutamol, mediante el dosaje de la enzima β -hexosaminidasa.

Evaluar los efectos inmunomoduladores sobre la síntesis de IFN- γ de la decocción/aceite esencial de *M.v.*



Figura 1. Un espécimen de *Achyrocline satureioides* (LAM) DC en su hábitat natural. La fotografía fue tomada en febrero de 2004.

Metodología

Material humano

Para los objetivos planteados, 38 pacientes de 1 a 30 años de edad, alérgicos a hongos anemófilos, fueron estudiados y caracterizados en la primera consulta. En todos los casos manifestaron no estar recibiendo medicación. En los ensayos *in vitro* fueron incluidas las células de los 38 pacientes alérgicos y de 10 individuos sanos. En todos los casos, de acuerdo con las normas de ética, se informó detalladamente sobre los estudios a realizar a los padres o responsables de los menores de edad, quienes firmaron su conformidad.

De acuerdo con las normas de ética, en todos los casos los padres de los pacientes dejaron por escrito su conformidad firmada para los estudios a realizar a partir de una muestra correspondiente a una alícuota de la sangre extraída para hemocitológico y otros exámenes de rutina. De cada individuo, se extrajeron aproximadamente 10 ml de sangre venosa periférica con jeringa y aguja estériles, que fueron colocados en tubos heparinizados.

Pruebas cutáneas

Todas las pruebas cutáneas fueron realizadas por un solo operador. Los extractos de alérgenos fúngicos fueron provistos por International Pharmaceutical Immunology, S.A. Se utilizaron goteros con 3 ml del extracto antigénico en 50% de solución de glicerina más 0,42% de fenol (concentración = 10.000 PNU/ml). Se aplicaron los alérgenos: *Hormodendrum* (*Cladosporium*), *Rizophus*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria*, *Mucor mucedo* y además para decocción de *M.v.* en concentración de 31,5 mg/ml.



Figura 2. Un espécimen de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling en su hábitat natural. La fotografía fue tomada en febrero de 2004.

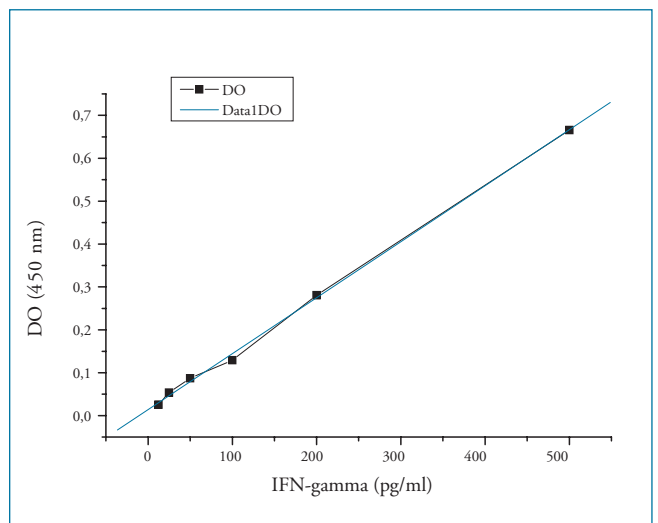


Gráfico 1. Curva patrón para dosaje de IFN- γ por EIA, con sueros testigos.

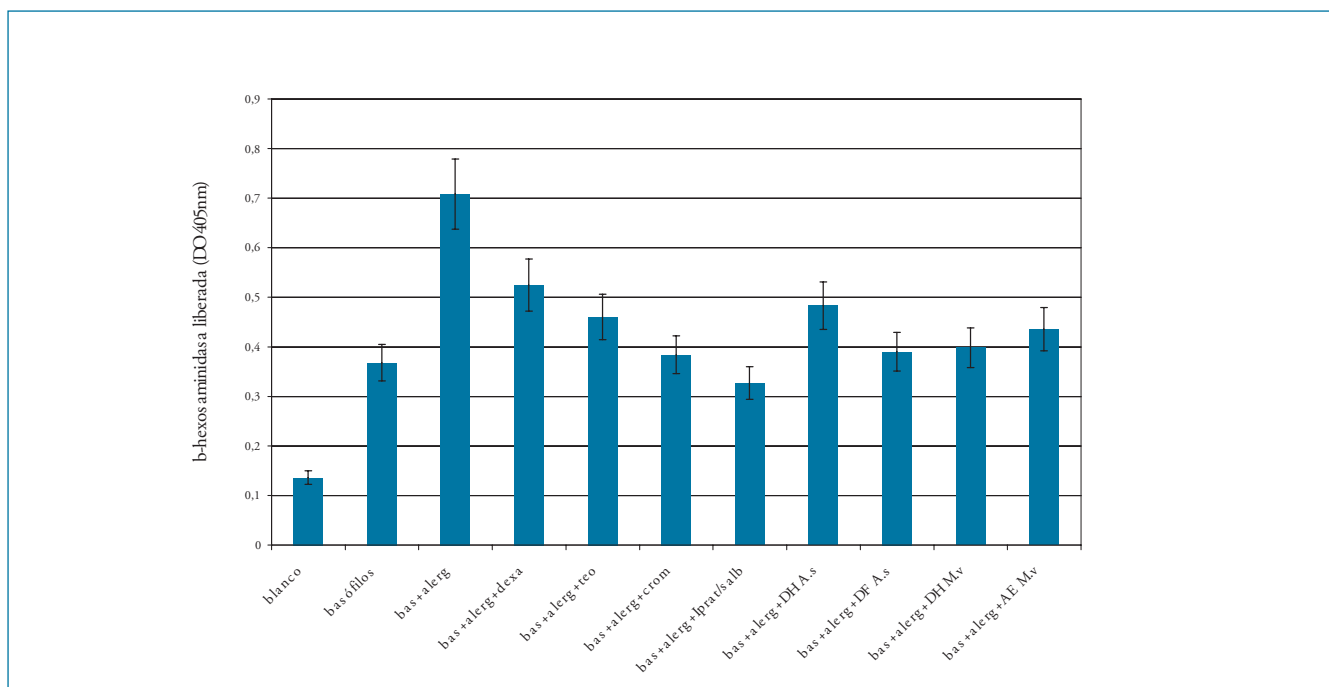


Grafico 2. Liberación de β -hexosaminidasa de basófilos de individuos alérgicos (n=38), medida en DO a 405 nm. Se observa disminución en los valores de DO cuando los basófilos en presencia del alérgeno específico fueron enfrentados a dexametasona (dexa) (0,04 mg/ml), teofilina (teo) (0,2 mg/ml), cromoglicato disódico (crom) (0,2 mg/ml), bromuro de ipratropio + salbutamol (Iprat/salbu) (0,05 mg/ml + 0,3 mg/ml) o a decocción de hojas o flores de *A. saturoioides* (DH A.s o DF A.s) (0,10 mg/m o 75 μ g/ml), decocción de hojas o aceite esencial de *M. verticillata* (DH M.v o AE M.v) (0,14 mg/ml o 0,08 mg/ml). Se realizó un blanco conteniendo RPMI-1640 solo. Además, células sin adición del alérgeno (basófilos) fueron evaluadas como control.

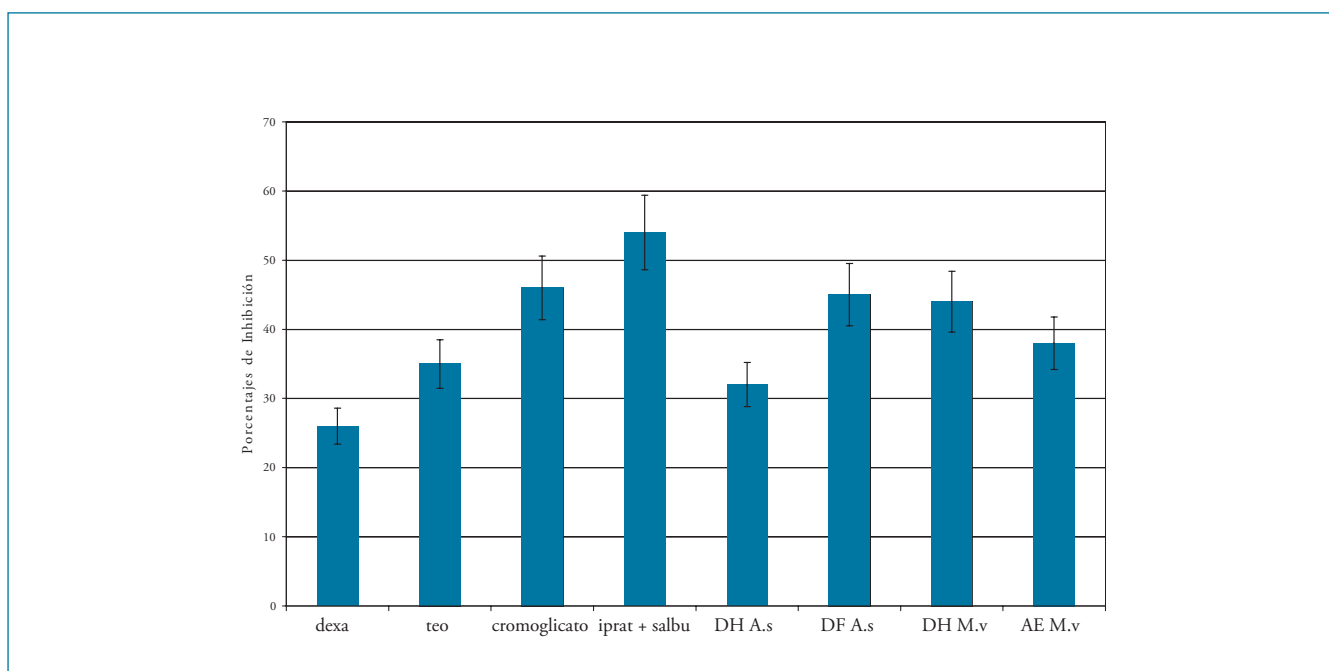


Grafico 3. Inhibición de la liberación de β -hexosaminidasa de basófilos de individuos alérgicos (n=38) por dexametasona (dex), teofilina (teo) cromoglicato disódico (cromoglicato), bromuro de ipratropio + salbutamol (iprat + salbut), o por decocción de hojas o flores de *A. saturoioides* (DH A.s o DFA.s) o decocción de hojas o aceite esencial de *M. verticillata* (DH M.v o AE M.v).

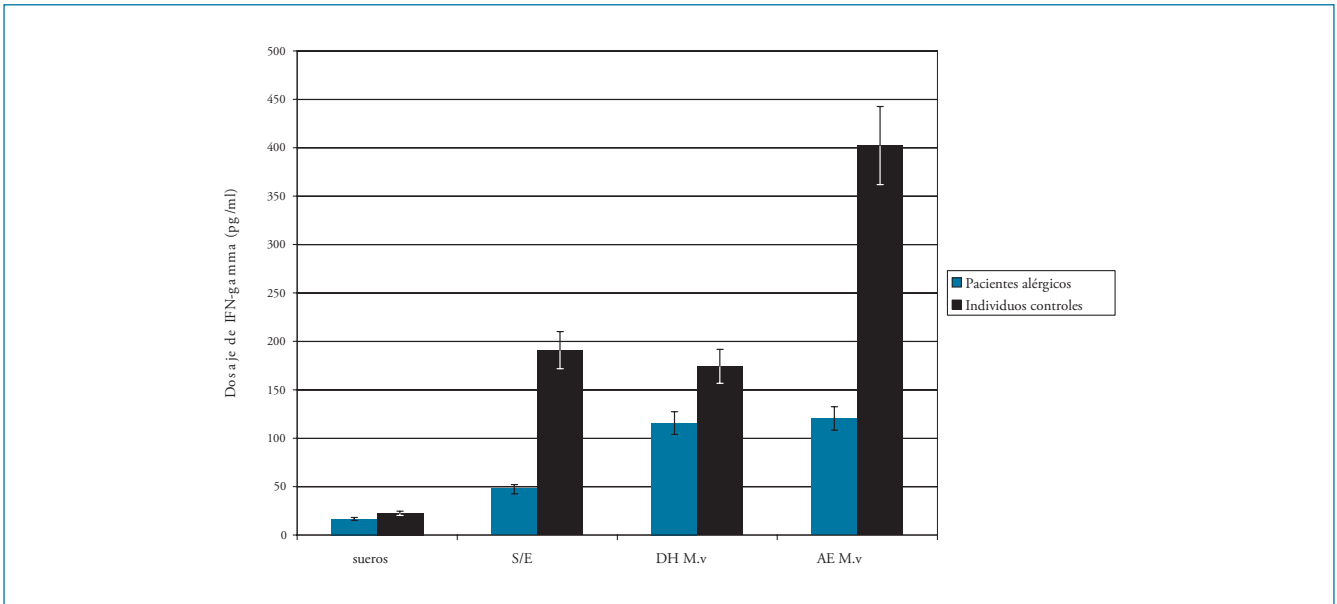


Gráfico 4. Dosaje de IFN- γ por EIA en sueros y sobrenadantes de cultivos de linfocitos provenientes de individuos alérgicos (n=20) e individuos sanos (n=10), sin estímulo (S/E) o estimulados con decocción de hojas o aceite esencial de *M. verticillata* (DH M.v o AE M.v).

Las testificaciones se realizaron sobre la piel de la espalda. Se aplicó el método de cutirreacción combinado con el de punturreacción: previa asepsia, se demarcaron 10 zonas con lápiz demográfico. En el centro de cada zona se realizó una escarificación con lanceta estéril Dome-Hollister-Stier Miles España, SA. Sobre cada impronta se colocó una gota de cada alérgeno. Se utilizó una lanceta individual para cada alérgeno, para efectuar repetidas punciones a través de cada gota de alérgeno para facilitar el pasaje del líquido. Se cuidó que las escarificaciones practicadas no provocaran sangrado. Se realizaron controles positivos con solución de fosfato de histamina 1:1000 (Eli Lilly Co Ind USA) equivalente a una gota de solución que contenía 0,1 mg de histamina/cc. Los controles negativos o reacciones testigos se realizaron con solución de fenol al 0,5% en agua destilada. Se realizaron las evaluaciones de las reacciones después de 20 minutos. Se consideraron positivas las reacciones con eritema mayor en 3 mm al diámetro de la roncha producida por el control negativo, roncha y pápula cualquiera fuera su diámetro y las reacciones de eritema igual o mayor a 10 mm.

Se realizaron las evaluaciones según la siguiente escala:

- (negativa). Sin modificación o igual al testigo.
- + (dudoso). Pápula menor al doble tamaño de la reacción testigo.
- + (positivo). Cuando el edema era el doble de la reacción testigo.
- ++ (positiva dos cruces). Edema mayor al doble de la reacción testigo.
- +++ (positiva tres cruces). Edema similar al anterior pero de bordes irregulares.
- ++++ (positiva cuatro cruces). Reacción más notable [64-67].

Dosaje de IgE sérica total

Se realizó la cuantificación de IgE sérica total en sueros de pacientes alérgicos a hongos ambientales, para confirmar su patología. Para llevar a cabo este ensayo se siguieron las instrucciones del equipo comercial Human IgE ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories Inc. Montgomery, Texas) que cuantifica la concentración de IgE por una técnica sándwich EIA [68].

Recolección del material vegetal

Se utilizaron hojas verdes y flores de *A.s.* recolectadas en la localidad de Alpa Corral, departamento de Río Cuarto, en marzo de 2005, y hojas verdes y talluelos de *M.v.* recolectadas en la localidad de Santa Rosa de Calamuchita, en febrero de 2005, provincia de Córdoba, Argentina. El material vegetal lavado y seco fue conservado a -20°C , en envases de vidrio rotulados, hasta su uso.

Las plantas fueron taxonómicamente identificadas por docentes del área Botánica de la UNRC, reservando un espécimen de cada una, en el herbario de la Institución.

Obtención de las fracciones vegetales: decocción de hojas/flores de A.s. y decocción de hojas de M.v.

Según la técnica utilizada por Mongelli E y cols. (1995), las decocciones se obtuvieron suspendiendo 5 g de hojas/flores de *A.s.* o 5 g de hojas de *M.v.* en 100 ml de agua destilada (concentración inicial 5%) en cada caso. Las mezclas se calentaron a temperatura de ebullición durante 20 minutos. Enfriadas, fueron clarificadas con papel Wattman N $^{\circ}$ 2 y luego con filtro Millipore de 0,4 μm de tamaño de poro. La concentración final de las decocciones fue estimada por diferencia entre el peso vegetal inicial y el peso del material vegetal seco retenido en

el papel de filtro, en función del volumen final obtenido. Las decocciones se fraccionaron en frascos color caramelo, se esterilizaron en autoclave a 115 °C por 20 minutos y se conservaron a -20 °C hasta su uso [69].

Se realizó control de esterilidad mediante siembra en medio thioglicolato con incubación sucesiva por 3 días a 37 °C y 10 días a 28 °C. Al momento de su uso en los ensayos, las diferentes diluciones de decocciones se realizaron con el medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, USA).

Obtención de la fracción vegetal: aceite esencial de M.v.

Para la obtención del aceite esencial, 60 g de hojas molidas fueron sometidas al proceso de destilación por arrastre con vapor de agua durante un período de 3h, utilizando un aparato tipo Clevenger modificado. Por decantación se separó la fracción oleosa de la acuosa y el agua emulsionada dentro del aceite fue extraída por precipitación mediante el agregado de Na₂SO₄. Las alícuotas de aceite se conservaron a -20 °C. Al momento de su uso en los ensayos fueron disueltas en RPMI-1640 con el agregado de dimetilsulfóxido (DMSO) [70].

Identificación y cuantificación de componentes de aceite esencial de M.v. por cromatografía gaseosa

Diversas metodologías pueden ser utilizadas para evaluar cualitativa y cuantitativamente una mezcla compleja de sustancias. Para los aceites esenciales los métodos analíticos de gran utilidad son la cromatografía gaseosa (CG) y la CG asociada a espectrometría de masa [71,72]. La identificación de los principales componentes del aceite esencial de M.v. se realizó por comparación de los tiempos de retención de éstos con los de los componentes puros (drogas patrones): pulegona, mentona, limoneno, cineol, α -pineno y β -pineno, que fueron inyectados, al 1% en diclorometano [73].

Evaluación de la capacidad inhibitoria de la desgranulación de basófilos por las drogas y fracciones vegetales

Concentración de basófilos

Para la obtención y el cultivo de las células basófilas se adoptó la metodología descrita por Grinstein M (1986). Estas células fueron separadas de la sangre venosa periférica con dextrán 70 al 6% y NaCl al 0,9% (Macrodex, Pharmacia-Uppsala Suecia). La fracción que contenía las células fue centrifugada a 400 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 1ml de RPMI-1640 [74].

Evaluación de la desgranulación de basófilos

Para evaluar el efecto de las drogas y las fracciones vegetales sobre la desgranulación de basófilos, se realizó el ensayo de liberación de la enzima β -hexosaminidasa. Se enfrentaron los basófilos de los pacientes alérgicos con el alérgeno específico solo: mezcla de extractos alérgicos de *Hormodendrum (Cladosporium)*, *Rizophus*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria* y *Mucor*

muucedo, en concentración de 100 PNU/ml y con el alérgeno adicionado de:

- Dexametasona (0,02; 0,04; 0,08 y 0,16 mg/ml) (Montpellier S.A, Argentina).
- Teofilina (0,05; 0,1; 0,2 y 0,4 mg/ml) (Phoenix, Argentina).
- Cromoglicato disódico (0,05; 0,1; 0,2 y 0,4mg/ml) (Phoenix, Argentina).
- Ipratropio + salbutamol (0,025+0,15; 0,05+0,3; 0,1+0,6 y 0,2+1,2 mg/ml) (Altana Pharma SA).
- Concentraciones de decocción de hojas de *A.s.* (0,75; 0,25; 0,10 y 0,05 mg/ml).
- Concentraciones de decocción de flores de *A.s.* (100; 75; 50 y 25 μ g/ml).
- Concentraciones de decocción de *M.v.* (0,56; 0,28; 0,14 y 0,07 mg/ml).
- Concentraciones de aceite esencial de *M.v.* (0,16; 0,08; 0,04 y 0,02 mg/ml).

Cincuenta μ l de la suspensión de basófilos, a una concentración de 1×10^5 , fueron colocados en cada orificio de una placa de 96 pocillos y preincubados por 15 minutos a 37°C con el alérgeno específico solo y con el alérgeno específico adicionado de cada una de las concentraciones de dexametasona o teofilina o cromoglicato disódico o bromuro de ipratropio + salbutamol o las diferentes concentraciones de decocciones o aceite esencial. Después de la incubación se agregaron 50 μ l del sustrato cromogénico para la enzima β -hexosaminidasa (4-nitro-phenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide) (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA) 1 mmol/l, disuelto en 0,1 mol/l de buffer citrato, pH 5. El sistema se incubó a 37 °C por una hora La reacción fue detenida con 200 μ l de buffer carbonato 0,1 M, pH 10,5 por pocillo. El producto del clivaje (4-nitrophenol) se interpretó por lectura espectrofotométrica a 405 nm en un lector ELISA (Labsystems Multiskan MS) [75].

El porcentaje de inhibición de la liberación de β -hexosaminidasa fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = (A - B) \times 100/A [2]$$

En donde **A** es la β -hexosaminidasa liberada por los basófilos en presencia del alérgeno solo y **B** es la β -hexosaminidasa liberada por los basófilos en presencia del alérgeno más el agregado de dexametasona, teofilina, cromoglicato disódico o bromuro de ipratropio + salbutamol o las diferentes concentraciones de decocciones o aceite esencial.

Dosaje de los niveles de IFN- γ en sueros y sobrenadantes de cultivos

Obtención de células mononucleares a partir de sangre venosa periférica

Las muestras de sangre venosa periférica humana de 20 de los 38 individuos alérgicos y 10 individuos sanos fueron diluidas al 1/2 en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (Sig-

ma, St. Louis, USA), luego se colocaron sobre Hystopaque®-1077 (Sigma, St. Louis, USA) en una relación 2:1 y se centrifugaron a 2.000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Para la obtención de las células mononucleares, la interfase fue recolectada y lavada 3 veces con medio RPMI-1640 [76].

Determinación de la viabilidad celular por tinción de exclusión al azul de tripán

Se analizaron las células a partir de una suspensión óptima de 1×10^6 células/ml. El azul de tripán (Sigma, St. Louis, USA) se preparó al 0,2 % (p/v) en agua destilada, y en el momento de usar se mezclaron 4 partes del colorante con 1 parte de NaCl al 4,5%. Para el ensayo de viabilidad se mezclaron partes iguales de la solución del colorante y la suspensión celular. Se contaron las células totales y las coloreadas empleando cámara hemocitométrica. El cálculo de células viables se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{número total de células viables}}{\text{número total de células}} \times 100$$

La lectura se realizó al microscopio óptico dentro de los 3 minutos de efectuada la tinción con azul de tripán [76].

Ensayo de proliferación linfocitaria

Los cultivos celulares se realizaron en una placa estéril de 96 pocillos (NUNCLO® Delta Nunc Inter Med, made in Denmark). Se colocaron las células en una concentración de 1×10^5 por pocillo en un volumen total de 200 μ l. Las células fueron cultivadas con RPMI-1640 adicionado de 25 mM de HEPES (Gibco Laboratories, Life Technologies Inc. Grand Island, NY, USA), 2 mM de L- glutamina (Parafarm, Industria Argentina), 5% de SFB (Gibco BDRL), 50 mM de 2-mercaptoetanol (2-ME), 100 U/ml de penicilina (Penicillin G potassium salt, Merck KGaA Darmstadt, Germany) y 100 μ g/ml de estreptomina (Merck KGaA Darmstadt, Germany). Las células fueron estimuladas en ensayos independientes con:

- Concentraciones de decocción de *M.v.*: 2,8; 1,4; 0,7 y 0,35 mg/ml,
- Concentraciones de aceite esencial de *M.v.*: 1; 0,8; 0,16 y 0,08 mg/ml.

Además, se realizaron cultivos controles con RPMI-1640, sin el agregado de estimulantes.

Las células fueron incubadas durante 72 hs a 37 °C con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Luego de la incubación, la placa fue centrifugada y los sobrenadantes fueron colocados en tubos eppendorf a -80°C hasta su uso [77].

Dosaje de IFN- γ

Para la interpretación de los resultados referidos a la cuantificación de IFN- γ fue necesario construir una curva de calibración según prescripción del laboratorio comercial.

Se calcularon las concentraciones de IFN- γ en sueros y sobrenadantes de cultivo de linfocitos estimulados con decocción o aceite esencial de *M.v.* y sin estímulo. A tal fin se aplicó la ecuación de regresión lineal: $Y = A + B \cdot X$, en donde $A = 0,01397 \pm 0,00543$ y $B = 0,0013 \pm 2,41$ (Gráfico 1).

Los niveles de IFN- γ fueron cuantificados en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos provenientes de 20 pacientes alérgicos y de 10 individuos sanos luego de la estimulación con decocción y aceite esencial en las concentraciones citadas. Estas experiencias se realizaron por duplicado. A modo de control, se cuantificó la citoquina en los cultivos de linfocitos sin estímulo, así como en los sueros. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del equipo comercial Human Interferón Gamma (Hu- IFN- γ) ELISA kit (PBL Biomedical Laboratories, USA) que cuantifica IFN- γ humano utilizando un inmunoensayo sándwich [78].

Análisis estadísticos

Los valores obtenidos en cada uno de los ensayos fueron expresados como promedios y desviación estándar. Los parámetros fueron comparados utilizando el programa GraphPad Prism versión 3.0 (Inc. San Diego, USA, 1998) y evaluados utilizando la prueba paramétrica de la t-Student para muestras apareadas. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa la que alcanzó un valor de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Caracterización de los pacientes alérgicos

Se observó en 24 de los 38 pacientes que la patología más importante era el asma y en 14 la rinitis. De acuerdo con las edades, los niveles de IgE séricos estuvieron elevados en 34 pacientes. Todos los pacientes alérgicos estudiados presentaron pruebas cutáneas positivas para: *Hormodendrum* (*Cladosporium*), *Rizophus*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria* y/o *Mucor mucedo*. Todos los casos resultaron negativos a la reactividad cutánea frente a *M.v.* La caracterización de estos pacientes se muestra en la Tabla 1.

Obtención de las fracciones vegetales

Decocción de hojas/flores de *A.s.*

Las decocciones de hojas/flores preparadas según Mongelli E et. al. (1995) alcanzaron concentraciones de 11 mg/ml y 6,2 mg/ml, respectivamente. Polydoro M y cols. (2004) obtuvieron una decocción de *A.s.* de hojas y flores de 7,5 mg/ml [69,79].

Decocción de hojas de *M.v.*

La fracción decocción de *M.v.* preparada según Mongelli E et. al. (1995) alcanzó una concentración de 31,5 mg/ml, lo que coincide con los datos obtenidos por Escobar F et. al (2004), los cuales trabajaron con *M.v.* recolectada en la misma época [69,80].

Tabla I: Caracterización de los individuos alérgicos: edad, síntomas en orden de importancia, valores de IgE sérica total y reactividad cutánea (cutirreacción + prick).

Paciente	Edad (años)	Síntomas	IgE UI/ml	M.v.	Pruebas cutáneas con alérgenos fúngicos				
					<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Hormodendrum</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Mucor</i>
1	1	As Ri	89	-	+	+	+	+	-
2	1	As Ri	139	-	+	-	-	-	-
3	1	As Ri	41	-	+	+	+	+	+
4	2	As Ri Ecc Pr	180	-	+	+	+	+	+
5	2	As Ri	512	-	++	++	+	+	+
6	2	As	43	-	+	+	+	+	++
7	2	As Ri Ecc	122	-	+	+	+	+	+
8	3	As Ri	68	-	+	+	+	+	-
9	3	Ri Ecc As	280	-	+	+	+	-	-
10	4	As Ri	790	-	+++	++	++	++	-
11	4	As Ecc Ri	355	-	+	+	++	+	+
12	5	As Ri Sin Pr	1133	-	++	+++	+++	+++	+
13	6	As Ri	1560	-	+	+	+	+	+
14	6	Ri, As	1236	-	++	+	-	-	-
15	7	Ri Si As	365	-	+	+	+	+	-
16	7	As Ri	760	-	++	++	+	+	-
17	9	As	292	-	+	+	+	+	+
18	9	As Ri	1000	-	+	+	+	+	+
19	10	Ri Si As	193	-	++	-	-	-	-
20	11	Ri As	1131	-	++	++	+	++	+
21	11	As Ri	786	-	++	++	++	++	++
22	12	Ri Ot As	220	-	+	+	+	+	-
23	13	Ri Si As	420	-	++	++	-	+	-
24	14	AsR i	325	-	+	-	-	-	-
25	14	Ri Si As	542	-	+	-	+	+	-
26	20	Ri Si As	122	-	+	+	+	+	+
27	20	Ri As	360	-	+++	++	++	++	+
28	22	Ri Ecc As	190	-	+	+	+	+	-
29	27	Ri Si As	269	-	+	+	+	-	-
30	27	As	208	-	++	+	+	+	+
31	28	Ri Ot As	220	-	+	+	+	+	-
32	28	As Ri Ecc Pr	180	-	+	+	+	+	+
33	28	As Ri	512	-	++	++	+	+	+
34	29	As	43	-	+	+	+	+	++
35	29	As Ri Ecc	122	-	+	+	+	+	+
36	29	As Ri Ecc	122	-	+	+	+	+	+
37	30	As Ri	68	-	+	+	+	+	-
38	30	Ri Ecc As	280	-	+	+	+	-	-

As: Asma, Ri: Rinitis, Ecc: Eccema, Pr: Prurigo, Si: Sinusitis, Ot: Otitis. M.v: decocción de *Mintostachys verticillata*.

(-): Negativa. Sin modificación o igual al testigo. (+): Positiva. Cuando el edema es el doble de la reacción testigo. (++) : Positiva dos cruces. Edema mayor al doble de la reacción testigo. (+++) : Positiva tres cruces. Edema similar al (++) pero de bordes irregulares. (++++): Positiva cuatro cruces. Reacción más notable.

Aceite esencial de *M.v.*

Se obtuvo una fracción rica en aceite esencial utilizando la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua según Adams R. P. (1995). La muestra oleosa presentó un color amarillo pálido, olor aromático típico y su densidad fue determinada en 0,82 g/ml. Su producción se logró a partir de una masa de 60 g de material vegetal que produjo un volumen crítico de aceite de 3,7 ml. En función de estos valores el análisis de rendimiento final fue de 6,16%. De Feo V y cols. (1998), trabajando con la misma especie vegetal, obtuvieron por la misma técnica aceite esencial con un rendimiento de 4,9%, valor relativamente menor al logrado en esta investigación [54,70].

El rendimiento alcanzado en nuestro estudio se consideró apropiado para compuestos de naturaleza terpenoide [81].

Identificación y cuantificación de componentes de aceite esencial de *M.v.* por cromatografía gaseosa

Entre los componentes mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *M.v.* se destacó la presencia de pulegona y mentona. Un 81,2% del total de los componentes fueron identificados y pulegona y mentona resultaron los mayoritarios, con valores de 62,97 y 16,40% respectivamente. Otros componentes en menor cantidad fueron también identificados: α -pineno (0,16%), β -pineno (0,27%), limoneno (1,87%) y 1,8-cineol (0,05%) (Tabla 2).

González Pereyra M.L., et. al, (2005) realizaron, por la misma técnica, un análisis del aceite esencial de *M.v.* recolectada en Santa Rosa de Calamuchita en Febrero de 2004. Ese estudio reveló la presencia de pulegona (63,68%), mentona (19,19%), α -pineno (0,58%), β -pineno (1,06%) y limoneno (2,98%) [82].

Estos mismos componentes mayoritarios y la relación porcentual entre ellos fueron informados también por De Feo V y cols. (1998) en estudios realizados a partir de la misma especie vegetal [54].

Inhibición de la liberación de la enzima β -hexosaminidasa

Los basófilos enfrentados con el alérgeno específico liberaron un alto porcentaje de la enzima β -hexosaminidasa confirmando la condición alérgica de estos pacientes específica para el alérgeno utilizado, ya que la enzima β -hexosaminidasa es un mediador químico preformado que se libera de mastocitos y basófilos en el proceso de desgranulación (5) (Gráfico 2).

Todas las drogas y las fracciones vegetales ensayadas disminuyeron la liberación de la enzima *in vitro* cuando se comparó con la liberación de la enzima de los basófilos + alérgeno ($p < 0,05$). El número de muestras de pacientes que respondieron al tratamiento fue variable (Tabla 3). Las concentraciones que presentaron mayor poder inhibitorio sobre la liberación de la enzima fueron: dexametasona (0,04 mg/ml), teofilina (0,2 mg/ml), cromoglicato disódico (0,2 mg/ml), ipratropio + salbutamol (0,05 + 0,3 mg/ml), decocción de hojas de *A.s.* (0,10 mg/ml), decocción de flores de *A.s.* (75 mg/ml), decocción de

Tabla 2. Porcentajes de los principales componentes presentes en el AE de *M. verticillata*.

Compuesto Identificado	Porcentaje
α -pineno	0,16
β -pineno	0,27
limoneno	1,87
cineol	0,05
pulegona	62,97
mentona	16,4
Total	81,72

Tabla 3. Números absolutos e índices de muestras de pacientes, desafiadas con el alérgeno, que respondieron *in vitro* a los efectos de cada droga o derivado vegetal ensayados, inhibiendo la liberación de β -hexosaminidasa.

Droga o derivado vegetal	Nº de muestras que respondieron al tratamiento sobre el total	Índices (%) de muestras que respondieron al tratamiento
Dexametasona	18 de 38	47
Teofilina	20 de 38	53
Cromoglicato disódico	18 de 38	47
Bromuro de ipratropio + salbutamol	30 de 38	79
DH <i>A.s.</i>	28 de 38	73
DF <i>A.s.</i>	29 de 38	78
DH <i>M.v.</i>	23 de 38	60
AE <i>M.v.</i>	21 de 38	55

M.v. (0,14 mg/ml), aceite esencial de *M.v.* (0,08 mg/ml).

El efecto de la decocción de hojas de *A.s.* fue similar al de dexametasona, mientras que el del aceite esencial de *M.v.* fue similar al logrado por teofilina ($p = ns$). La decocción de flores de *A.s.* y decocción de hojas de *M.v.* mostraron efecto similar al de cromoglicato ($p = ns$). De todas las drogas ensayadas *in vitro*, la más efectiva resultó la combinación de bromuro de ipratropio + salbutamol, con una diferencia altamente significativa, respecto de los basófilos + alérgeno ($p < 0,0001$) (Gráfico 2).

Fue mayor el número de muestras individuales que respondieron al tratamiento frente a bromuro de ipratropio, seguido de decocción de flores de *A.s.* y decocción de hojas de *A.s.* Las decocciones vegetales probadas resultaron efectivas sobre mayor número de muestras que dexametasona, teofilina y cromoglicato disódico (Tabla 3).

Las drogas investigadas inhibieron la liberación de la enzima en la mayoría de los casos. Los resultados fueron los esperados, ya que son drogas utilizadas frecuentemente con óptimos resultados en algunos pacientes (23-25,83-86). Fueron consi-

derados los índices de inhibición de la liberación de la enzima, alcanzados por cada droga o derivado vegetal. Dexametasona resultó la menos efectiva para inhibir la liberación de β -hexosaminidasa (26%) comparada con las otras ensayadas. Teofilina le siguió en efectividad (35%). Cromoglicato disódico (47%) y bromuro de ipratropio + salbutamol (54%) alcanzaron los mayores niveles de inhibición de la liberación de la enzima. De los derivados vegetales ensayados, resultaron de mayor efectividad la decocción de flores de *A.s.* (46%) y la decocción de hojas de *M.v.* (44%) y las menos efectivas fueron decocción de hojas de *A.s.* (33%) y aceite esencial de *M.v.* (38%) (Gráfico 3).

Estos hallazgos sobre los efectos inhibidores de la desgranulación de estas fracciones vegetales confirman la utilización de estas hierbas en medicina popular para el tratamiento de las crisis de asma [46,47,54].

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con numerosas bibliografías, donde se demuestra que extractos y sustancias terpenoides derivadas de vegetales inhiben la liberación de β -hexosaminidasa con efectos comparables a varios antialérgicos. Morikawa T y cols. (2002) estudiaron el efecto inhibitorio *in vitro* de dos constituyentes aislados de *Acer nikoense*, una hierba japonesa, sobre la liberación de β -hexosaminidasa en la línea celular RBL-2H3. Ambos constituyentes mostraron una capacidad inhibitoria mayor que fumarato de ketotifeno. El mismo grupo de investigación aisló dos nuevos sesquiterpenos del rizoma de *Hedychium coronarium*, los cuales mostraron una potente actividad inhibitoria de la liberación de β -hexosaminidasa *in vitro*, comparable con fumarato de ketotifeno [3,87].

Pratibha N y cols. (2004) demostraron que una combinación de extractos de siete plantas medicinales (*Phyllanthus emblica*, *Piper nigrum* y *Piper longum*, entre otras) inhibió en un 65% la desgranulación de mastocitos de ratones, mientras que prednisolona inhibió sólo el 44,7% [88].

Tao J y cols. (2003) demostraron el efecto inhibitorio de la liberación de la enzima β -hexosaminidasa de varios compuestos tales como: dialheptanoides, diterpenos y flavonoides. También evaluaron el mismo efecto, de una antraquinona aislada de *Rubia yunnanensis* y demostraron que su actividad fue mayor que cromoglicato disódico y fumarato de ketotifeno [89].

Weng JR y cols. (2004) encontraron que dos terpenos aislados de las semillas de *Garcinia subelliptica* tuvieron efecto inhibitorio *in vitro* de la liberación de β -glucuronidasa e histamina de mastocitos de rata, producida por el compuesto 48/80 [90].

Na HJ y cols. (2002) evaluaron la capacidad inhibitoria *in vitro* de una preparación de hierbas orientales, sobre la liberación de β -hexosaminidasa en células de rata, obteniendo un 13,7% de inhibición, al cual no consideraron significativo [2]. Los resultados obtenidos en este ensayo valorizan el potencial etnomedicinal de las especies: *A.s.* y *M.v.* ya que se demostró que las fracciones derivadas de estos vegetales tienen la capacidad de inhibir el proceso de desgranulación de basófilos humanos *in vitro*, disminuyendo la liberación de la enzima β -hexosaminidasa en porcentajes significativos. El efecto inhibitorio

que demostraron las fracciones vegetales fue comparable al producido por las drogas ensayadas de mayor efectividad *in vitro*.

Por otra parte se realizó el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa enfrentando a los basófilos con cada uno de los derivados vegetales, sin la adición del alérgeno. En ningún caso se observó liberación de β -hexosaminidasa, lo que se correlacionó con los resultados de las pruebas cutáneas demostrando que estas fracciones vegetales no fueron alérgicas.

Existe bibliografía referente a estudios realizados con diferentes hierbas para evaluar su potencial antialérgico *in vivo*.

Remberg P y cols. (2004) desarrollaron un spray nasal que contenía una mezcla de aceite esencial y flavonoles de *Artemisia abrotanum* L., para uso terapéutico en pacientes con rinitis alérgica y otros desórdenes de la vías aéreas altas. Luego de la administración del spray nasal los pacientes experimentaron una significativa disminución de los síntomas nasales comparable con varios anti-histamínicos utilizados previamente por los pacientes [91].

Una preparación polihierbaria fue estudiada en India por sus efectos antiasmáticos en varios modelos experimentales, utilizando ratas y cerdos guinea. Se observó que la preparación fue capaz de inhibir significativamente la desgranulación de mastocitos peritoneales, inducida por el compuesto 48/80 y por albúmina de huevo. La inhibición fue comparable con cromoglicato disódico, ketotifeno y prednisolona [92].

Como las decocciones de hojas/flores de *A.s.* y decocción de hojas y aceite esencial de *M.v.*, demostraron un efecto inhibitorio *in vitro* de la desgranulación de basófilos, disminuyendo la liberación de β -hexosaminidasa con un potencial similar al de las drogas comerciales ensayadas, estaría justificada su aplicación fitomedicinal, previos ensayos de citotoxicidad y estudios en modelos experimentales *in vivo*.

Dosaje de IFN- γ

En sueros de pacientes alérgicos como de controles, los niveles de IFN- γ fueron bajos, sin diferencias estadísticas entre ambos grupos (Gráfico 4). Los datos son consistentes pues se ha demostrado, excepto durante una infección viral activa o por bacterias intracelulares, que en sueros, es muy difícil encontrar niveles significativos de IFN- γ [93,94].

En los cultivos de células sin estímulo se cuantificaron niveles elevados de IFN- γ en ambos grupos. Hubo diferencias entre los niveles de IFN- γ encontrados en estos cultivos y los niveles de la citoquina en sueros: en alérgicos ($p < 0,05$) y en controles ($p < 0,001$) (Gráfico 4). Estos resultados eran esperados, pues en alérgicos la síntesis y liberación de IL-4 de mastocitos, basófilos y LTh2, inhibió la producción de IFN- γ [1].

De las concentraciones de *M.v.* ensayadas, 0,7 mg/ml de decocción y 0,16 mg/ml de aceite esencial mostraron incremento en la producción de IFN- γ con diferencia significativa respecto de los cultivos sin estímulo ($p < 0,05$). En los sobrenadantes de cultivos de células de los controles, estimuladas con la decocción, los niveles de IFN- γ no se modificaron respecto de los cultivos sin estímulo ($p = ns$) (Gráfico 4).

Los resultados obtenidos en este ensayo coinciden con Nakada T y cols. (2002), Ko E y cols. (2004) y Takayuki N y cols. (2004), quienes investigaron la capacidad de otras hierbas medicinales para favorecer la desviación Th1 aumentando la producción de IFN- γ [8,95,96].

Estos hallazgos sugieren que decocción o aceite esencial de *M.v.* podrían tener aplicación *in vivo* para potenciar la síntesis y liberación de IFN- γ e incrementarían los efectos reguladores fisiológicos asociados a IFN- γ tales como: disminución del cuadro alérgico, incremento de la capacidad antiviral e incremento de la actividad citotóxica del sistema inmune.

Conclusiones

Las decocciones de *A.s.* así como decocción y aceite esencial de *M.v.* demostraron un efecto inhibitor *in vitro* de la desgranulación de basófilos producida por el alérgeno específico, disminuyendo la liberación de β -hexosaminidasa. Estos resultados confirmarían científicamente sus propiedades antialérgicas y explican su utilización en medicina folklórica para las crisis de asma. Los productos ensayados derivados de *A.s.* así como de *M.v.* podrían tener aplicación fitomedicinal.

Los derivados vegetales inhibieron la liberación de la enzima β -hexosaminidasa *in vitro*, por lo que se justificaría iniciar investigaciones de los efectos de estas fracciones vegetales en estudios *in vivo* para comprobar si disminuyen los síntomas alérgicos.

Las decocciones del vegetal manifestaron un potencial antialérgico similar al de las drogas comerciales ensayadas: teoflina y cromoglicato disódico. Además se demuestra que bromuro de ipratropio + salbutamol es de las drogas probadas la más efectiva para inhibir la liberación de la enzima β -hexosaminidasa, consecuencia de la desgranulación de basófilos producida por el estímulo alérgico. Bromuro de ipratropio + salbutamol alcanzó los mayores índices de respuesta en los pacientes, seguida por las decocciones de flores y de hojas de *A.s.* Los hallazgos estimulan el emprendimiento de futuros estudios *in vivo* para utilizar los derivados vegetales como alternativa terapéutica en este tipo de patologías.

Los resultados corroboran la eficacia diagnóstica de la prueba de liberación de la enzima β -hexosaminidasa para identificar el alérgeno específico involucrado en la patología alérgica. Esta técnica accesible, de fácil realización, podría reemplazar o complementar las prácticas diagnósticas habituales. La técnica permite evaluar la respuesta de los basófilos de cada paciente frente al tratamiento instituido. Permite la selección del medicamento que será más útil en cada paciente. Se observaron falta de respuesta o pobres efectos de cada droga sobre los basófilos de ciertos pacientes.

Las fracciones vegetales derivadas de *M.v.*, probadas en este estudio fueron capaces estimular la proliferación de la población de linfocitos Th1, que se tradujo en un incremento de la secreción de IFN- γ . Una terapia que utilice derivados vegetales no tóxicos y capaces de estimular la síntesis de IFN- γ sería fa-

vorable para el tratamiento de las enfermedades alérgicas. Decocción de hojas y aceite esencial de *M.v.* de conocida actividad mitogénica mostraron efectos inmunomoduladores al estimular la subpoblación de LTh1 productores de IFN- γ . La decocción de hojas de *M.v.* resultó más efectiva sobre linfocitos de pacientes alérgicos que de controles para inducir la síntesis de IFN- γ . Los LTh1 de pacientes alérgicos resultaron más sensibles que las células de controles frente a la decocción de hojas de *M.v.* para la producción de IFN- γ .

El estudio de las propiedades biológicas de *A.s.* y *M.v.* en relación con el campo de la Inmunología contribuye al enriquecimiento del conocimiento etnobotánico de la flora de la provincia de Córdoba, y tiene un impacto adicional fuertemente positivo ya que estimula la preservación de esta especie vegetal. Los hallazgos podrían permitir contar con productos con efecto antialérgico, como alternativa terapéutica para aquellos pacientes que no responden a las terapias convencionales.

Bibliografía

1. Janeway, C.; Travers, P.; Walport, M.; Donald Capra, J. 1999. Immunology the immune system in health and disease. En: Janeway, CH.; Travers, P.; Walport, M.; Donald Capra J. Immunobiology. Ed. Garland Publishing, New York. 4th ed. New York, US, Part I, chap 4:154-5. ISBN 0-8153-3217-3
2. Na HJ, Jeong HJ, Bae J, Kim YB, Park ST, Yun YG, Kim HM. Tongkyutang inhibits mast cell-dependent allergic reactions and inflammatory cytokines secretion. *Clínica Química Acta* 2002; 35-41.
3. Morikawa T, Tao J, Ueda K, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XXXI. Structure of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from Japanese folk medicine, the stem bark of *Acer nikoense*. *Chem. Pharm. Bull* 2003; 51 (1) 62-57.
4. Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, Yoshikawa M. Anti-allergic activity of stilbenes from Korean rhubarb (*Rheum undulatum* L.): structure requirements for inhibition of antigen-induced degranulation and their effects on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004) 4871-4876.
5. Lu Y, Wu M, Zhou H. Changes of phospholipase D activity of rat peritoneal mast cells in degranulation. *Acta Pharmacol Sin*. 2004 Jan; 25(1):104-109
6. Debes GF, Dahl ME, Mahiny AJ, Bonhagen K, Campbell DJ, Siegmund K, Erb KJ, Lewis DB, Kamradt T, Hamann A. Chemotactic responses of IL-4-, IL-10-, and IFN-gamma-producing CD4+ T cells depend on tissue origin and microbial stimulus. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2671.
7. Yu J, Wei M, Becknell B, Trotta R, Liu S, Boyd Z, Jaung MS, Blaser BW, Sun J, Benson DM Jr, Mao H, Yokohama A, Bhatt D, Shen L, Davuluri R, Weinstein M, Marcucci G, Caligiuri MA. Pro- and Antiinflammatory Cytokine Signaling: Reciprocal Antagonism Regulates Interferon-gamma Production by Human Natural Killer Cells. *Immunity*. 2006 May;24(5):575-90.
8. Braun M. Hipersensibilidad tardía y otras reacciones de inmunidad mediada por la activación de macrófagos. En: Margni R. Inmunología e Inmunología. Editorial Médica Panamericana. 1996, 16: 304.
9. Ko E, Rho S, Lee E, Seo Y, Cho C, Lee Y, Min B, Shin M, Hong M, Bae H. Traditional Korean medicine (SCRT) modulate Th1/Th2 specific cytokine production in mice CD4+ T cell. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004 (92) 121-128
10. Sierra Monge JLL, Baeza Bacab MA, Serrano A. Tratamiento del asma. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1995; 52(7): 443-50.
11. Cloutier MM. Asthma. In: Dworkin PH. Pediatrics. 3rd edition. Connecticut: William and Wilkins; 1996: 400-5.

12. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci.* 1998;94:557-572.
13. Barnes PJ. Allergy Review Series VII: Intracellular signaling and regulation of allergic reactions. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy* 2001; 56: 928-936.
14. Hall SE, Lim S, Witherden IR, et al. Lung type II cell and macrophage annexin I release: differential effect of two glucocorticoids. *Am. Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):114-121.
15. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999;55:825-857.
16. John M, Lim S, Seybold J, et al. Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1 α GM-CSF and IFN- γ release from alveolar macrophages in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;157:256-262.
17. Walsh GM. Mechanisms of human eosinophil survival and apoptosis. *Clin. Exp. Allergy.* 1997;27:482-487.
18. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105:847-859.
19. Szefer SJ, Leung DY. Glucocorticoid-resistant in asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur. Respir J.* 1997;10:1640-1647.
20. Adcock IM, Brown CR, Shirasaki H, Barnes PJ. Effect of dexamethasone on cytokine and phorbol ester stimulated c-Fos and c-Jun DNA binding and gene expression in human lung. *Eur. Respir J.* 1994;7:2117-2123.
21. Gagliardo R., Chaney P, Vignola A.M. Glucocorticoid receptor β and α in glucocorticoid dependent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2000 162:7-13.
22. Ohta K, Fukuchi Y, Grouse L, Mizutani R, Rabe KF, Rennard SI, Zhong NS. A prospective clinical study of theophylline safety in 3810 elderly with asthma or COPD. *Respir Med.* 2004 Oct;98(10):1016-24
23. Kuna P. Current recommendation for asthma treatment. *Pol Merkuriusz Lek.* 2004 May;16 Suppl 1:24-9.
24. Lipworth B J. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2005; 365: 167-75
25. Gluck J C, Gluck P A. Asthma controller therapy during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2005 192, 369e80.
26. Krawiec ME, Wenzel SE. Inhaled nonsteroidal anti-inflammatory medications in the treatment of asthma. *Resp Care Clin N Am* 1999; 5(4): 555-74.
27. Milgron H, Tausing LM. Keeping children with exercise-induced asthma active. *Pediatrics* 1999; 104(3): 3-8.
28. Jahnova E, Harvatova M, Gazdik F. Expression of adhesion molecules and effect of sodium cromoglycate treatment in asthmatics. *Physiol Resp* 1998; 47(6): 439-43.
29. Harvatova M, Podivinsky F, Gazdik F, Jahnova E. Effect of disodium cromoglycate treatment on peripheral blood mononuclear cell adhesion to cultured endothelium in allergic asthmatic. *Physiol Resp* 1998; 47(6): 445-51.
30. Matsuse H, Matsuo N, Shimoda T, Obase Y, Asai S, Khono S et al. Sodium cromoglycate inhibits antigen induced cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from atopic asthmatic in vitro. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83(6): 511-5.
31. Nathan RA, Minkwitz MC, Bonacelli CM. Two first line therapies in the treatment of mild asthma: use of peak flow variability as a predictor of effectiveness. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82(5): 497-503.
32. Volovitz B, Tabachnik E, Nussinovitch M, Shtaf B, Blau H, Gil I et al. Montelukast a leucotriene receptor antagonist reduce the concentration of leucotrienes in the respiratory tract of children with persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(6): 1162-7.
34. Kato Y, Muraki K, Fujitaka M, Sakuva N, Ueda K. Disodium cromoglycate use in children and adolescents with asthma: correlation between plasma concentrations and protective effects for various inhalation methods. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83(6): 553-8.
35. Kato Y, Muraki K, Fujitaka M, Sakura N, Ueda K. Plasma concentrations of disodium cromoglycate after various inhalation methods in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(2): 154-7.
36. Everard ML, Bara A, Kurian M, Elliott TM, Ducharme F, Mayowe V. Anticholinergic drugs for wheeze in children under the age of two years. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jul 20;(3):CD001279.
37. Sposato B, Mariotta S, Ricci A, Bruno P, Terzano C, Mannino F. The influence of ipratropium bromide in the recovery phase of methacholine induced-bronchospasm. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2005 Mar-Apr;9(2):117-23.
38. Kim KT, Kerwin E, Landwehr L, Bernstein JA, Bruner D, Harris D, Drda K, Wanger J, Wood CC; Pediatric Atrovent Nasal Spray Study Group. Use of 0.06% ipratropium bromide nasal spray in children aged 2 to 5 years with rhinorrhea due to a common cold or allergies. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005 Jan;94(1):73-9.
39. Anthracopoulos MB, Karatz AA, Davlouros PA, Chiladakis JA, Manolis AS, Beratis NG: Effects of two nebulization regimens on heart rate variability during acute asthma exacerbations in children. *J Asthma.* 2005 May;42(4):273-937.
40. Latchman YE, Xu XJ, Poulter LW, Rustin MHA, Atherton DJ, Brostoff J. Chinese Medical Herbs in the treatment of atopic dermatitis. *Allergy & Clinical Immunology International.* 2002; 14,1:4-9.
41. Felix Berumen JA, Gonzalez Diaz SN, Canseco Gonzalez C, Arias Cruz A. Use of alternative medicine in the treatment of allergic diseases. *Revista Alergia México* 2004 Mar-Apr; 51 (2): 41-4.
41. Xue C.C., Hugel H.M., Li C.G., Story D.F. Efficacy, chemistry and pharmacology of chinese herbal medicine for allergic rhinitis. *Curr. Med. Chem.* 2004, 11(11):1403-21.
42. Boelcke, O. 1992. Plantas vasculares de la Argentina. Nativas y Exóticas. pp. 78-83. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina.
43. Parodi, L. & M. Dimitri. 1988. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, I (2) pp.1-92. Edit ACME.SACI. Buenos Aires. Argentina.
44. Nuñez C y Cantero JJ. Las plantas medicinales del sur de Córdoba. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto 2000. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
45. Simoes, C., E. Schenkel, L. Bauer & A. Langeloh. 1988. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. *Compositae. Journal of Ethnopharmacology* 22(3): 281-293.
46. Desmarchelier, C., J. Coussio & G. Ciccía. 1998. Antioxidant and free radical scavenging effects in extract of medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31 (9): 1163-1170.
47. Gutkind, G., V. Martino, N. Graña, J. Coussio, R. & R.Torres. 1982. Screening of South American Plants for Biological Activities. 1. Antibacterial and Antifungal Activity. II (5): 213-218.
48. Caceres, A., E. Jaurequi, D. Herrera & H. Legemonn. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of Dermatococcal infection. 1. Screening of 38 plants extracts for anticandidal activity. *Flavor and Fragrance Journal*, 13: 163-165.
49. Zanón SM, Ceriati FS, Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 1999;41 (2): 59-62.
50. Carney J., J. Krenisky, R. Williamson & J. Luo. 2002. Achyrofurane, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. *Journal of Natural Products.* 65(2): 203-205.
51. Kadarían, C., A. Broussalis, J. Miño, P. Lopez, S. Gorzalczy & C. Acevedo. 2002. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. *Pharmacological Research* 45, 1: 57-61
52. Arredondo M., F. Blasina, C. Echeverry, A. Morquio, M. Ferreyra, J. Abin-Carriquiry, L. Lafon & F. Dajas. 2004. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethno-pharmacology* 91: 13 -20.
53. Gugliucci, A. & T. Menini. 2002. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. *Life Sciences* 71(6): 693-705.
54. De Feo, V. ; Ricciardi, A. ; Biscardi, D. ; Senatore, F. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl. Lamiaceae. *Journal of Essential Oil Research.* 1998; 10: 61-65.
55. Fester GA, Martinuzzi EA, Retamar JA, Ricciardi AI. Aceites esenciales de la República Argentina. Editorial Academia Nacional de Ciencias. Córdoba Argentina. 1961, pág.3-9.
56. Senatore F. Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling.

- (Lamiaceae) from Perú. *Flavour and Fragrance Journal*. 1998 (13):263-265.
57. Dimitri MJ. Descripción de las especies cultivadas en la Argentina. En: Dimitri MJ (Ed), *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, Editorial ACME, Buenos Aires. 1980, p. 925.
 58. Ratera EL, Ratera MO. Plantas que curan. In: Ratera EL, Ratera MO (Ed), *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 1980, p. 43-85.
 59. Sorau SB, Bandoni AL. Labiadas. In: Sorau SB, Bandoni AL (Ed), *Plantas de la Medicina Popular Argentina*. Albatros, Buenos Aires. 1994, p. 62-64.
 60. Muñoz F. *Plantas medicinales y aromáticas*. Editorial Mundi Prensa. 1987, p. 15-23.
 61. Sagrera Ferrandiz, J. *Plantas Medicinales. Tratamiento de las enfermedades por medio de las plantas*. Latros Ediciones Ltda. Bogotá. Colombia. 1993, p.7-10.
 62. Primo V, Rovera M. Determinación de la actividad bacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. *Revista Argentina de Microbiología* 2001; 33: 113-117.
 63. Cariddi LN, Sabini LI, Maldonado AM. 2005. Propiedades inmunológicas y mitogénicas de productos derivados de *Minthostachys verticillata* sobre linfocitos de niños alérgicos con infección viral. *Archivos Alergia e Inmunología Clínica* 36(2):35-40.
 64. Epelbaun A. La testificación. En Mathov E: *Curso Práctico completo en Alergia e Inmunología para clínicos y pediatras*. 1973 Edit Publicaciones Médicas Argentinas. Buenos Aires 1,14: 227-245
 65. Bousquet J. In vivo methods for study of allergy: skin tests, techniques and interpretation, in Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW (eds): *Allergy: Principles and Practice*, CV, Mosby, St Louis, Chapter 19, 1988.
 66. Kay AB. ABC of allergies: Good allergy practice. *BMJ* 1998; 316: 535-537
 67. Barbaud A, Goncalo M, Bruynzeel D, Bircher A: Guidelines for performing skin tests with drugs in investigation of cutaneous adverse drug reactions. *Contact dermatitis* 2001; 45: 321-328
 68. Bora et al., 2004. *J Immunol Methods*. 293 (1-2):43-50,
 69. Mongelli E, Desmarchelier C, Coussia J, Ciccía G. Actividad antinicrobiana e interacción con el ADN de plantas medicinales de la amazonia Peruana. *Rev. Arg. Microbiol.* 1995; 27: 199-203.
 70. Adams, RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Publishing Corporation. 1995, IL, USA.
 71. Masada Y. *Análisis de Essential oil by Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. Wiley, New York. 1976.
 72. McLafferty, F. *Wiley registry of Mass Spectral Data*. Wiley, New York. 1994.
 73. Mímica-Dukié, N.; Gasic, O.; Kite, G.; Fellow, L. And Jancic, R.. "A study of the Essential Oil of *Mentha longifolia* Growing in Yugoslavia". *Planta Medica*. 1991, 57, Supplement Issue 2. A 83.
 74. Grinstein M, Simkin G, Alonso MR, Helvani R, Mathov E. Test de degranulación de basófilos humanos como un método in vitro para el diagnóstico y prevención de reacciones adversas a drogas. *Rev Arg Asma, Alergia e Inmunol.* 1986; 3,8:765-786
 75. Shibata H, Yagi T. Rate assay of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase with 4-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosaminide as an artificial substrate. *Clin. Chim. Acta*. 1996; 251(1) 53-64.
 76. Mongini C, Waldner C. *Metodologías para la evaluación de las células inmunocompetentes*. En: Margni R. *Inmunología e Inmunoquímica*. Editorial Médica Panamericana. 1996, 36:747 y 769.
 77. Tuchscherer M, Kanitz E, Otten W, Tuchscherer A. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86 (2002) 195-203.
 78. Kelder B, Rashidbaigi A, and Petska S. A Sandwich Radioimmunoassay for Human IFN- γ , in *Methods in Enzymology*. 1986; Vol. 119 (S. Petska, ed.), Academic Press, New York, 582-587.
 79. Polydoro M, de Souza KCB, Andrades ME, Da Silva EG, Bonatto F, Heidrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EES, Bassani VL, Moreira JCF: Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences* 74 (2004) 2815 – 2826.
 80. Escobar F, Demo M., Mattana C., Sabini L.I. Análisis de la capacidad citotóxica de aislamientos clínicos humanos de *Helicobacter pylori* y evaluación de derivados de *Minthostachys verticillata* para inhibir la toxina VacA y/o al microorganismo productor. Trabajo final para optar la título de Microbiólogo. 2004 Biblioteca Universidad Nacional de Río Cuarto Fac. Cs. Ex. Fco-Qcas Y Nat.
 81. Zigadlo J, Maestri D, Lamarque A, Guzmán C, Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso M, García-Vallejos M, Grosso N. Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1996 24(4):319-323.
 82. González Pereyra M.L., Cariddi L.N., Ybarra F, Isola M.C., Demo M.S., Sabini L., Maldonado A.M. Immunomodulating properties of *Minthostachys verticillata* on human lymphocytes and basophils. *Revista Alergia México*. 2005 (52)3:105-112.
 83. Waddell AN, Patel SK, Toma AG, Maw AR. Intranasal steroid sprays in the treatment of rhinitis: is one better than another? *J Laryngol Otol*. 2003 Nov;117(11):843-5.
 84. Park HY, Park SH, Yoon HK, Han MJ, Kim DH. Anti-allergic activity of 18beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide. *Arch Pharm Res*. 2004 Jan;27(1):57-60.
 85. Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clin Immunol*. 2004 Jan;110(1):13-21.
 86. Ohta K, Fukuchi Y, Grouse L, Mizutani R, Rabe KF, Rennard SI, Zhong NS. A prospective clinical study of theophylline safety in 3810 elderly with asthma or COPD. *Respir Med*. 2004 Oct;98(10):1016-24
 87. Morikawa T, Tao J, Ueda K, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal food-stuffs. XXXI. Structure of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from Japanese folk medicine, the stem bark of *Acer nikoense*. *Chem. Pharm. Bull* 2003;51 (1) 62-57.
 88. Pratibha N, Saxena VS, Amit A, D'Souza P, Bagchi M, Bagchi D. Anti-inflammatory activities of aller-7, a novel polyherbal formulation for allergic rhinitis. *Int J Tissue React*. 2004;26(1-2):43-51.
 89. Tao J, Morikawa T, Ando S, Matsuda H, Yoshikawa M. Bioactive constituents from Chinese Natural Medicines.XI. Inhibitors on NO production and degranulation in RBL-2H3 from *Rubia yunnanensis*: structures of rubianosides II, II, and IV, rubianol-g and rubianthraquinone. *Chem Pharm Bull*. 2003 51(6)654-662.
 90. Weng JR, Tsao LT, Wang JP, WU RR, Lin CN. Anti-inflammatory phloroglucinols and terpenoids from *Garcinia subelliptica*. *J Nat Prod*. 2004 Nov; 67 (11): 1796-9
 91. Remberg P, Bjork L, Hedner T, Sterner O. Characteristics, clinical effect profile and tolerability of nasal spray preparation of *Artemisa abrotanum* L. for allergic rhinitis. *Phytomedicine*. 2004 Jan;11(1):36-42.
 92. Shah G.B. and Parmar N.S. Antiasthmatic property of polyherbal preparation E-721 B. *Phytother. Res*. 2003, 17(9):1092-7.
 93. Moura EP, Toledo VPCP, Oliveira MHP, Spíndola de Miranda S, Andrade HM, Guimarães TMPD. Pulmonary tuberculosis: evaluation of Interferon- γ levels as an immunological healing marker based on the response to the *Bacillus Calmette-Guerin*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. May 2004; 99(3):283-287.
 94. Ho C, Lau C, Kim C, Leung K, Fung K, Tse T, Chan H, Chow M. Differential effect of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes in vitro. *International Immunopharmacology*. 4 (2004) 1549-1557.
 95. Nakada T, Watanabe K, Jin GB, Triizuk K, Hanawa T. Effect of ninjinyouei-to on Th1/Th2 type cytokine production in different mouse strain. *Am J Chin Med*. 2002;30(2- 3):215-23.
 96. Takayuki N., Yumiko A., Michiko E., Shin-yu N., Takeshi Y., Tadahiro T., Haruki Y. Anti-allergic activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. *International Immunopharmacology*. 2004 4:1353-1365.